Review Article

Science and Technology of Farm Animal Transgenesis

Shahin Eghbalsaied, Ph.D.[1], Kamran Ghaedi, Ph.D.[2, 3*], Mohsen Forouzanfar, Ph.D.[4, 5], Mehdi Hajian, M.Sc.[4], Sayed Morteza Hosseini, DVM[4], Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D.[2, 4*]

1. Animal Sciences Department, Agricultural College, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Khorasgan, Iran
2. Cell and Molecular Biology Department, Royan institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
3. Biology Department, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Reproduction and Development Department, Royan institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
5. Biology Department, School of Sciences, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran

** Corresponding Addresses: Corresponding Addresses: P.O.Box: 19395-4644, Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran*
Email: kamranghaedi@royaninstitute.org

P.O.Box: 19395-4644, Reproduction and Development Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 18/ Aug/2008, Accepted: 14/Dec/2008

Abstract

Over the past two decades, many approaches for transferring genes into the genome of domestic animals have been devised. The main purposes of transgenesis are: to increase animal capabilities, to knock down or silence both onco-genes and deleterious genes, and to produce a pharmaceutical protein. Transgenesis techniques include pronuclear microinjection (PNM), somatic cell nuclear transfer (SCNT), viral infection (VI) and sperm-mediated gene transfer (SMGT). The first transgenic mouse was produced by using the PNM technique and transgenic animals from other species (rabbit, sheep, pig and cattle) have been produced thereafter. However, the PMN technique had certain drawbacks: low efficiency, random integration site of the transgene and a high mosaic rate. For this reason, other alternative techniques have been devised to overcome its drawbacks. The most reliable method for transgenesis which bypasses mosaics is SCNT. However, this method is complicated and tedious; with multiple stages that need setting up. VI has been used to transfer genes into the oocytes and zygotes with high efficiency and versatility. In spite of its simplicity, the maximum transgene length should be less than 8.5 kb. Currently, spermatozoa are considered as an alternative method of carrying transgenes into the oocytes with minimum technical demands. In contrast to VI, SMGT is being used successfully to transfer different kinds of BACs with more than 200 kbp into mouse oocytes. The present review summarizes the methods by which transgenes can be introduced into zygotes of domestic animals.

Keywords: Transgenesis, Microinjection, Transgenic Animals

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 78-87

مروری بر دانش و تکنولوژی انتقال‌ژن در حیوانات مزرعه‌ای

شاهین اقبال سعید .Ph.D[1]، کامران قائدی .Ph.D[2,3*]، محسن فروزانفر .Ph.D[4,5]،
مهدی حاجیان .M.Sc[4]، سید مرتضی حسینی DVM[4]، محمد حسین نصر اصفهانی .Ph.D[2,4*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، خوراسگان، ایران
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
۴. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین، اصفهان، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، دانشکده علوم، گروه بیولوژی، مرودشت، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، اصفهان، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
پست الکترونیک: Email: kamranghaedi@royaninstitute.org

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، اصفهان، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولید مثل و تکوین
پست الکترونیک: Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۲۴

چکیده

در طول دو دهه گذشته، روش‌های زیادی برای انتقال‌ژن (Transgenesis) به ژنوم حیوانات اهلی معرفی شده است. انتقال‌ژن با اهداف افزایش قابلیت‌های حیوانات، حذف یا خاموش‌کردن ژن‌های معیوب و سرطان‌زا و ایجاد داروهای زیستی انجام می‌گیرد. تکنیک‌های انتقال‌ژن شامل: ریزتزریق به داخل پیش هسته، انتقال هسته سلول‌های بدنی، انتقال‌ژن از طریق ویروس‌ها و اسپرم است؛ هرچند ریزتزریق به داخل پیش هسته اولین تکنیکی بوده که توانسته موش‌های ترانس‌ژنیک را ایجاد کند و از آن به بعد برای ایجاد سایر گونه‌های ترانس‌ژنیک (خرگوش، گوسفند، خوک و گاو) استفاده شود، اما به دلیل معایب زیاد همچون بازدهی بسیار کم، وارد شدن تصادفی ترانس‌ژن به داخل ژنوم میزبان و نرخ موزاییک زیاد از تکنیک‌های جایگزین برای انتقال‌ژن استفاده می‌شود. تکنیک انتقال هسته سلول‌های بدنی معتبرترین تکنیکی است که در انتقال‌ژن استفاده می‌شود و حیوان ترانس‌ژنیک ایجاد شده در این روش فاقد سلول‌های موزاییک بوده است. با این وجود مراحل انجام کار، پیچیده و خسته‌کننده بوده و نیاز به بهینه‌سازی بیشتری دارد. مراحل انجام کار استفاده از لنتی‌ویروس‌ها برای انتقال‌ژن به درون تخمک یا سلول تخم دارای بازدهی بالا ساده است که مهم‌ترین محدودیت این روش عدم توانایی حمل ترانس‌ژن‌هایی با طول بیش از ۸/۵ کیلوباز است. روش بسیار ساده دیگر، استفاده از اسپرم به عنوان حامل ترانس‌ژن به تخمک است که با استفاده از روش کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی به طول بیش از ۲۰۰ کیلوباز، با بازدهی بسیار بالا به تخمک موش منتقل می‌شود. بنابراین مقاله حاضر شامل روش‌های مختلفی است که می‌توان به وسیله آن ترانس‌ژن را به داخل تخمک یا جنین حیوانات اهلی منتقل کرد.

* **کلیدواژگان:** انتقال‌ژن، ریز تزریق، حیوانات تراریخته

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۸۷-۷۸

مقدمه

انتقال ژن (Transgenesis) به مفهوم وارد شدن یک توالی DNA خارجی به داخل ژنوم یک موجود زنده چندسلولی می‌باشد به طوری که ژن مورد نظر در اغلب سلول‌های آن حضور داشته و به نسل بعد منتقل شود. در گذشته از اصطلاحات: موجودات تغییر یافته ژنتیکی (Genetically Modified Organisms; GMO)، گیاهان تغییر یافته ژنتیکی (Genetically Modified Plants; GMP) و حیوانات تغییریافته ژنتیکی (Genetically Modified Animals; GMA) استفاده می‌شد. از GMO برای گیاهان ترانس‌ژنیکی که برای انسان و حیوانات عامل تغذیه‌ای بوده استفاده می‌شده، هر چند معنای آن شامل تمامی موجودات زنده بوده است. به همین دلیل از دو اصطلاح GMP و GMA به ترتیب برای گیاهان و حیوانات تغییریافته ژنتیکی استفاده شده است (۱).

انتقال‌ژن به منظور افزودن اطلاعات ژنتیکی خارجی به ژنوم یک موجود زنده، سرکوب کردن یک ژن داخلی و جایگزین کردن یک ژن و یا یک ژن کاربردی که ممکن است جهش یافته همان ژن یا یک ژن کاملا متفاوت با ژن بومی باشد، انجام می‌گیرد. سرانجام در اغلب تحقیقات، افزودن یک ژن خارجی به ژنوم میزبان منجر به ایجاد یک پروتئین با یک عملکرد فیزیولوژیکی خاص می‌گردد (۲). تولید داروهای تجاری از طریق حیوانات ترانس‌ژنیک یکی از مهم‌ترین کاربردهای این تکنولوژی است که زیست دارو (Biopharming) نام دارد. به عنوان مثال می‌توان به تغییر خصوصیات تغذیه‌ای شیر گاو برای استفاده کودکان و بهبود عملکرد حیوانات، اشاره کرد (۲). طبق گزارش ماگا در آخرین کنگره جهانی کاربرد ژنتیک در تولیدات دامی (Genetics applied in Animal Production; GAAP) هم اکنون ۵ نوع از حیوانات ترانس‌ژنیک در جهان وجود دارد (۳): خوک‌های ترانس‌ژنیک دارای ژن فیتاز که قابلیت هضم فسفر بهتری دارند(۴)، گاوهای ترانس‌ژنیک دارای ژن لایزوستافین که به ورم پستان مقاومت زیادتری دارند (۵)، گاوهای ترانس‌ژنیک دارای ژن‌های کاپا و بتاکازئین که ترکیب شیر بهتری دارند (۶)، خوک‌های ترانس‌ژنیک دارای ژن آلفالاکتالبومین که وزن آن‌ها ازشیرگیری، نتاج بهتری

دارد (۷) و بزهای ترانس‌ژنیک دارای ژن لایزوزیم که سلامتی پستان بهتری دارند (۸). البته ایجاد حیوانات ترانس‌ژنیک دیگری نیز گزارش شده‌است که ممکن است به‌دلیل زنده نبودن در گزارش ماگا آورده نشده باشد. از جمله این حیوانات می‌توان به گوسفندان دارای وزن پشم شسته بیش از ۶ درصد (۹)، خوک‌های دارای گوشت لخم زیادتر (۱۰) و یا کیفیت گوشت بهتر (۱۱) اشاره کرد. تلاش برای ایجاد حیوانات اهلی ترانس‌ژنیک هم اکنون در حال انجام است که تاکنون نتایج موفقیت‌آمیزی از آن‌ها گزارش نشده است.

روند انتقال‌ژن شامل دو مرحله جداگانه است: ۱. فراهم نمودن روشی که بتوان اطلاعات ژنتیکی را از فضای خارج سلولی و نیز غشای پلاسمایی عبور داده و به هسته سلول رساند ۲. آماده‌سازی شرایطی که پذیرش اطلاعات ژنتیکی جدید را به عنوان بخشی از ژنوم میزبان داشته باشد. بر خلاف این موضوع، بخش اعظم تحقیقات شناخت روش‌های جدید برای افزایش عبور ترانس‌ژن از موانع موجود در سلول و رسانیدن آن به هسته است و کمتر به مرحله دوم انتقال‌ژن به درون ژنوم سلول میزبان پرداخته شده است (۱۲). مقاله حاضر به بررسی تکنیک‌های مختلف انتقال‌ژن به حیوانات اهلی با تکیه بر توانمندی‌ها، مزایا و معایب آن می‌پردازد.

تزریق به داخل پیش‌هسته (Pronuclear Microinjection; PNM)

زمانی‌که گوردون در سال ۱۹۸۰ در دانشگاه یال دانشجو بود، امکان انتقال DNA خارجی را به جنین‌های موش بررسی کرد (۱۳). وی با تزریق یک ژن خارجی به داخل پیش‌هسته جنین‌ها توانست موش‌های تراریخته را ایجاد کند؛ در واقع او اولین کسی بود که از کلمه تراریخته استفاده کرد. سپس سه گروه از محققین توانستند با همین روش، خرگوش (۱۴)، گوسفند (۱۵) و خوک (۱۶) تراریخته را ایجاد کنند. از آن پس، مطالعات زیادی با استفاده از این روش در زمینه‌های بیولوژی، اصلاح دام و پزشکی انجام شد که عمده این مطالعات بر روی موش بوده است.

انجام این تکنیک به لحاظ تئوری بسیار ساده است؛ حجم کمی از مایع حاوی ترانس‌ژن موردنظر را به داخل پیش‌هسته زیگوت تزریق کرده سپس زیگوت‌ها را به رحم‌های گیرنده منتقل می‌کنند. از آن جایی که این تکنیک به مهارت و صبر زیاد محقق نیاز دارد، یکی از مشکلات این است که هر چند در بسیاری از گونه‌ها از جمله موش و انسان، پیش‌هسته بدون انجام تیمار خاصی به سادگی قابل مشاهده است، اما در برخی گونه‌ها نظیر گوسفند و بز مشاهده پیش‌هسته تنها با تمرین و مهارت زیاد امکان‌پذیراست. در برخی گونه‌های دیگر نظیر گاو و خوک به دلیل تیرگی فوق‌العاده سیتوپلاسم، لازم است با استفاده از سانتریفیوژ، محتویات لیپیدی سلول به یک طرف منتقل گردیده تا پیش هسته‌ها مشاهده شوند. لازم به ذکر است روش انجام کار به پروتوکل خاصی نیاز ندارد (۱۷).

فراسنجه‌های مؤثر بر بازدهی این تکنیک شامل فورمولاسیون بافر تزریق شده، شکل DNA (خطی یا حلقوی)، محل تزریق (پیش هسته یا سیتوپلاسم) و غلظت DNA می باشد. غلظت DNA و روش خالص‌سازی DNA یا ترانس‌ژن از فراسنجه‌های مؤثر بر بقا، جنین‌ها هستند. خالص‌سازی با استفاده از ژل آگارز نسبت به روش‌های سانتریفیوژ با دور بالا و گرادیان کلریدسدیم سبب افزایش بقا جنینی می‌شود (۱۸).

از سوی دیگر، در اغلب تحقیقات از بافر Tris-EDTA برای انتقال‌ژن به داخل پیش هسته یا سیتوپلاسم استفاده می‌شود. درحالی‌که این بافر مختص آزمایش‌های زیست‌شناسی مولکولی بوده و عامل مطلوب و ایده‌آلی در آزمایش‌های جنین‌شناسی نیست. بهترین بافر می‌بایست از نظر فشار اسمزی نزدیک به سیتوپلاسم جنین باشد. تاکنون بهترین بافری که می‌بایست با شرایط سیتوپلاسم و ترانس‌ژن سازگار باشد، مشخص نشده‌است و حتی برخی محققین توانستند با موفقیت از آب به عنوان بافر استفاده کنند (۱۹).

ایجاد حیوانات اهلی تراریخته نسبت به موش با تاخیر مواجه بوده‌است که یکی از دلایل آن، عدم وضوح ساختار پیش هسته حیوانات اهلی نسبت به موش می‌باشد (۲۰). از سوی دیگر، زمان ایجاد غشای پیش هسته مشخص کننده زمان تزریق است که در گونه‌های مختلف، متفاوت است (۱۷). برای ورود ترانس‌ژن به ژنوم میزبان لازم است ترانس‌ژن قبل از مرحله سنتز (S) در پیش‌هسته حضور داشته باشد تا طی مراحل همانندسازی DNA وارد ژنوم میزبان شود (۲۱).

یکی از مواردی که در مطالعات مربوط به فراسنجه‌های مؤثر بر بازدهی انتقال‌ژن خیلی به آن توجه نمی شود، اندازه ترانس‌ژن است. البته دلیل این کار تا حدود زیادی قابل توجیه است. ترانس‌ژن‌هایی با اندازه‌های مختلف از چند کیلوباز تا کروموزوم‌های مصنوعی (۱ تا ۲ مگاباز) با موفقیت و بازدهی نسبتا مشابه (۰/۱ تا ۱ درصد) به حیوانات اهلی منتقل شده‌اند. البته کار با Bacterial Atrificial Chromosomes (BAC)، Yeast Atrificial Chromosomes (YAC) و P1- derived Atrificial Chromosomes (PAC) نیاز به تکنیک‌ها، وسایل و مهارت‌های خاص دارد (۲۲). روش جالبی که برای انتقال ترانس‌ژن‌های با اندازه بزرگ استفاده می‌شود، دارای مراحل زیر است: ابتدا ژن مورد نظر را به چند قطعه کوچک تقسیم کرده، سپس توالی‌های هومولوگوس را به ابتدا و انتهای آن اضافه می‌کنند. قطعات طراحی شده به طور هم‌زمان به داخل پیش هسته تزریق می‌شوند. این قطعات در نواحی هومولوگ (به طول ۲ کیلوباز) روی هم می‌افتند و ژن اولیه موردنظر را ایجاد می کنند. دانشمندان با استفاده از این روش توانسته‌اند در ۷۰ درصد از موش‌ها، توالی مورد نظر را به صورت فعال منتقل کنند(۲۳). انتقال‌ژن‌های کدکننده آنتی‌بادی‌ها و ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی بدن که طول زیادی دارند، می‌تواند با این روش انجام شود. علاوه‌براین، برای غلبه بر اثرات جانبی سایر ژن‌ها بر بیان ترانس‌ژن موردنظر می‌توان از توالی‌های اضافی با طول زیاد استفاده کرد.

مهم‌ترین عیب ریزتزریق به داخل پیش‌هسته که در تمامی گونه‌ها مشاهده می‌شود، بازدهی کم آن است که از اولین مطالعات انجام‌شده تاکنون کمتر از ۵ درصد گزارش شده‌است. بیش از ۸۰ درصد از جنین‌ها در مراحل اولیه تزریق، از دست می‌روند و از ۲۰ درصد باقی‌مانده به طور متوسط در گونه‌های مختلف ۵ تا ۱۰ درصد آن‌ها دارای ترانس‌ژن می‌باشند که فقط ۷۰ درصد از آن‌ها قادر به انتقال‌ژن به نسل بعد هستند (۲۱).

بااین‌وجود، روش‌های مختلفی برای افزایش قابلیت این تکنیک ارائه گردیده است که از جمله آن‌ها تزریق ترانس‌ژن به داخل هر دو پیش‌هسته است. هرچند که این تکنیک توانست نسبت جنین‌های تراریخته را در موش به میزان ۶۰ درصد و نسبت موش‌های تراریخته را ۱۰۰ درصد افزایش دهد (۲۴) ولی به دلیل کاهش نرخ بقا جنین‌ها، مورد استقبال چندانی قرار نگرفت.

روش دیگری که با موفقیت زیادی همراه بوده، استفاده از آنزیم‌های برشی محدودکننده (Restriction Modifying Endonucleas-es; REMI) است. در این روش ابتدا ترانس‌ژن را با یک اندونوکلئاز محدودکننده برش داده سپس همان آنزیم محدودکننده را به همراه ترانس‌ژن به داخل پیش‌هسته تزریق می‌کنند. استفاده از آنزیم برشی محدودکننده باعث ایجاد برش درجایگاه‌های خاصی از ژنوم میزبان و پلاسمید مورد استفاده خواهد شد که در نهایت منجر به تحریک سیستم ترمیمی DNA و افزایش نرخ واردشدن ترانس‌ژن در جایگاه‌های بریده شده DNA ژنومی می‌شود. استفاده از آنزیم‌های محدودکننده برای اولین بار در مخمر باعث افزایش نرخ واردشدن ترانس‌ژن به میزان ۲۰ برابر حالت معمول (۲۵) و در موش به میزان دو برابر گروه کنترل گردید (۲۶).

برای رفع مشکل ورود تصادفی، ترانس‌ژن به ژنوم میزبان به ابتدا و انتهای ترانس‌ژن توالی‌هایی که مشابه توالی ژن هدف هستند، افزوده می‌شود. بنابراین، واردشدن ترانس‌ژن به ژنوم میزبان از طریق نوترکیبی هومولوگوس بوده که در جایگاه‌های خاصی انجام شده و از طرف دیگر نرخ واردشدن ترانس‌ژن به داخل ژنوم میزبان نیز افزایش می‌یابد (۲۷). ریت و همکارانش توانستند با افزودن توالی‌های مشابه توالی Alu (در ژنوم گاو به میزان زیادی تکرار می‌شود) به یک ترانس‌ژن، نرخ واردشدن آن را به میزان چهار برابر نسبت به گروه کنترل افزایش داده و نوترکیبی هومولوگوس را ایجاد کنند (۲۸).

براساس گزارش‌های موجود یکی ازمهم‌ترین معایب این تکنیک آن است که حدود ۹۰ درصد از جنین‌های انتقال یافته به رحم‌های گیرنده فاقد ترانس‌ژن هستند (۱۸). بنابراین تشخیص جنین‌های تراریخته قبل از انتقال آن‌ها، بسیاری از هزینه‌ها را کاهش می‌دهد. از روش‌های مختلفی برای مشخص‌کردن جنین‌های تراریخته استفاده می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از PCR برای آزمون وجود ترانس‌ژن است. عیب این روش آن است که اگر ترانس‌ژن به صورت اپی‌زوم وارد سیتوپلاسم یا هسته سلول شود، نتیجه PCR مثبت کاذب خواهد شد. استفاده از تکنیک FISH برای مشخص کردن محل دقیق ورود ترانس‌ژن به کروموزوم‌ها، یک روش بسیار مطلوب است. باتوجه به این که با افزایش زمان، میزان بیان ترانس‌ژن‌هایی که به صورت اپی‌زوم وارد شده‌اند کم می‌شود، استفاده از RT-PCR برای نشان‌دادن میزان بیان ژن نیز می‌تواند مفید واقع شود.

یکی از جالب‌ترین روش‌های تشخیص جنین‌های تراریخته، استفاده از ژن‌های نشان‌گر به همراه ترانس‌ژن است. این نشان‌گر ممکن است باعث ایجاد مقاومت به نوعی آنتی بیوتیک، نظیر ژن مقاومت به نئومایسین و یا پورومایسین شود (۲۰). بدین ترتیب، جنین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک زنده مانده و رشد می‌کنند و جنین‌هایی که ژن نشان‌گر در آن‌ها بیان نشده‌است، حذف می‌شوند. در این روش، فرض براین است که ژن نشان‌گر و ترانس‌ژن با یکدیگر وارد سلول تخم شده است. تمامی جنین‌هایی که ژن نشانگر را بیان کرده‌اند، حامل ترانس‌ژن نیز هستند. درعمل، ممکن است برخی از جنین‌ها فقط حامل ترانس‌ژن بوده و ژن نشانگر را نداشته باشند و برعکس. ولی در بیش از ۷۰ درصد موارد این فرض صحیح است(۲۰). امروزه اغلب پلاسمیدها علاوه بر ترانس‌ژن مورد نظر حامل یک یا دو ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کاناماسین، آمپی‌سیلین و نئومایسین می‌باشند.

ژن‌های نشان‌گر دیگری نیز شناخته شده‌اند که باعث ایجاد نور فلورسنت می‌شوند. برای مثال می‌توان به پروتئین فلورسنت سبزرنگ (Green Fluorescent Protein; GFP) و لوسیفراز اشاره کرد. امروزه در اغلب مطالعات از ژن کدکننده پروتئین پیشرفته فلورسنت سبز رنگ (Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP) به عنوان ژن مارکری استفاده می‌شود (۲۹).

به طورکلی امروزه به دلیل مشکلات ذکر شده، استفاده از این روش در حال کاهش است و برای رفع معایب آن سعی شده است از تکنیک‌های دیگری که نیاز به تنظیمات کمتری داشته و سبب بازدهی زیادتری می‌شود، استفاده شود.

انتقال هسته سلول‌های بدنی
(Somatic Cell Nuclear Transfer; SCNT)

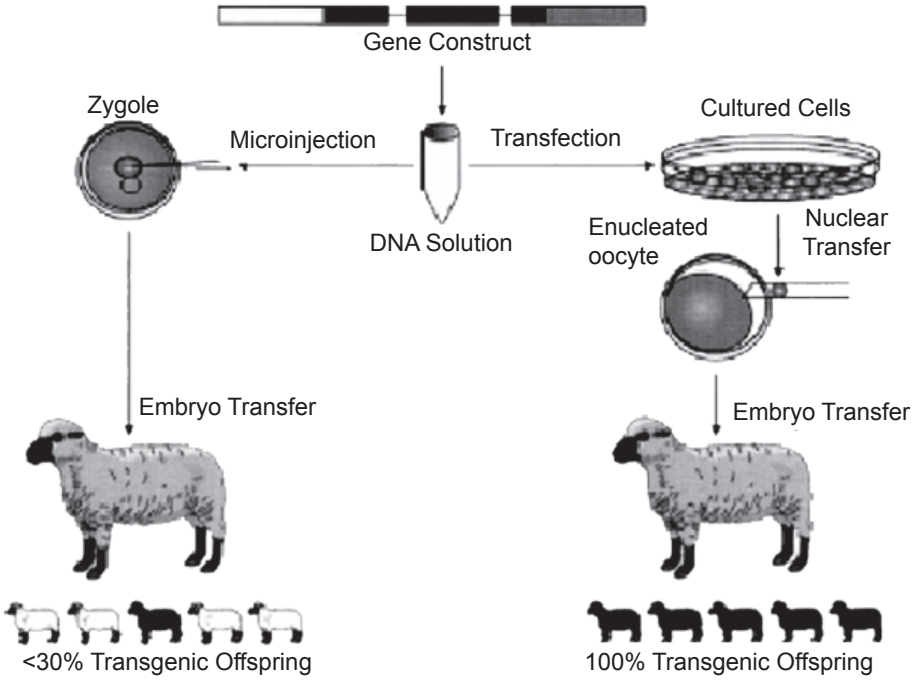
این تکنیک شامل انتقال هسته از یک سلول دهنده به یک سلول گیرنده است که به طور معمول سلول گیرنده یک تخمک بالغ است که کروموزوم‌های آن حذف شده‌است. پس از انتقال هسته از سلول دهنده به سیتوپلاسم سلول گیرنده (تخمک)، می‌بایست فعال‌سازی تخمک جهت شروع مراحل جنینی، به‌صورت مصنوعی انجام شود (شکل ۱).

برای اولین بار اسپیمن پیشنهاد کرد که با انتقال هسته از سلول‌های تمایز یافته به سلول تخم فاقد هسته، می‌توان فرد جدیدی را ایجاد کرد (۳۰). چند سال بعد بریگس و کینگ با انتقال هسته از جنین‌های ابتدایی نوزاد قورباغه به داخل سلول تخم‌هایی که هسته آن‌ها از قبل خارج شده‌بود، توانستند نوزاد قورباغه زنده را ایجادکنند (۳۱). به دلیل کوچک بودن اندازه سلول تخم پستانداران نسبت به دوزیستان، تا سال‌های اخیر موفقیت این تکنیک در پستانداران به تعویق افتاد (۳۲). سرانجام سولتر و مک گراد توانستند با انتقال هسته به تخمک، موش‌های زنده را ایجاد کنند (۳۳). همچنین ویلادسن با انتقال هسته از جنین‌های ۸-۱۶ سلولی به تخمک‌های مرحله متافاز II توانست بره‌های زنده را ایجاد کند. پس از این گزارش در گاو، خوک و سایر گونه‌ها نیز ایجاد حیوانات شبیه‌سازی شده با موفقیت انجام گرفت (۳۴).

تولد دالی در سال ۱۹۹۶ توانست به عنوان نماد شبیه‌سازی اولین پستاندار، تحول بزرگی در این علم ایجاد کند و امکان شبیه‌سازی را با استفاده از سلول‌های بدنی تمایز یافته که خاصیت همه‌توانی خود را از دست داده‌اند - فراهم کرد (۳۵). سپس با استفاده از این روش، گاو و خوک نیز شبیه‌سازی شدند (۳۶، ۳۷). ویلموت و همکاران توانستند با استفاده از سلول‌های مرحله ۹ روزگی جنینی، فیبروبلاست‌های مرحله ۲۶ روزگی جنینی و سلول‌های اپی‌تلیال پستان از یک گوسفند ۶ ساله، حیوانات شبیه‌سازی‌شده زنده را ایجادکنند (۳۸).

در ایران رویانا اولین گوسفند شبیه‌سازی شده خاورمیانه در سال ۲۰۰۶ بود که با استفاده از تکنیک انتقال هسته از سلول‌های فیبروبلاست گوش یک قوچ به درون تخمک‌های بدون هسته‌شده گوسفند ایجاد شد (۳۹) و سبب شد کشورمان در رده کشورهای صاحب این فناوری محسوب گردد. مقایسه کارآیی سلول‌های کومولوس تخمدان و سلول‌های فیبروبلاست گوش در تکوین قبل از لانه گزینی جنین‌های شبیه‌سازی شده گوسفند توسط محققان کشورمان نشان داد که نوع سلول دهنده هسته اثر چشمگیری بر توان کلی تولید بلاستوسیست ندارد (۴۰).

گوسفند پالی باانتقال‌ژن کدکننده فاکتور IX انسانی به سلول‌های فیبروبلاست جنینی و سپس انتقال این سلول‌های ترانس‌فکت شده به داخل تخمک‌های بدون‌هسته، ایجاد شد (۴۱). گوسفند تراریخته نیز که ژن ایجاد کلاژن آن جایگزین شده بود، با همین روش ایجاد گردید (۴۲).



شکل ۱: تولید گوسفند ترانس‌ژن با استفاده از روش انتقال هسته سلول‌های سوماتیک (۴۲)

ایجاد حیوانات تراریخته از طریق انتقال هسته سلول‌های بدنی دارای مزایای متعددی نسبت به سایر روش‌هاست. ابتدا می‌توان تغییرات ژنتیکی در سلول‌های کشت داده‌شده را با استفاده از روش‌های مختلف ترانس‌فکشن نظیر لیپوفکشن و الکتروپوریشن، انجام داده سپس با انتقال آنها به تخمک‌های بالغ، حیوان تراریخته را ایجاد کرد. حتی می‌توان سلول‌هایی را انتخاب کرد که ژن مورد نظر را در سطح خاصی بیان کنند. مزیت دیگر این تکنیک ممانعت از ایجاد حیوانات موزاییک است و بازدهی ایجاد حیوانات نسبت به روش تزریق به داخل پیش‌هسته بیش از دو برابر است(۴۳).

انتقال ژن از طریق ویروس‌ها (Viral Infection; VI)

اساس انتقال‌ژن از طریق ویروس‌ها مبتنی بر انتقال‌ژن‌های خارجی به داخل جنین‌ها از طریق ویروس‌های نوترکیب است. برای اطمینان از انتقال ترانس‌ژن به سلول‌های دختری و نیز به نسل بعد، لازم است از ویروس‌هایی استفاده شود که به طور پایدار وارد ژنوم سلول میزبان شوند. از رتروویروس‌ها به دلیل داشتن همین دو خصوصیت به عنوان حامل ترانس‌ژن به داخل جنین استفاده می‌شود (۴۴). مطالعات جنیش و همکاران بر روی جنین‌های موش در مرحله قبل از لانه‌گزینی، واردشدن رتروویروس و ترانس‌ژن را به داخل ژنوم آن‌ها نشان داد (۴۵). سپس همین گروه نشان دادند که پروتوویروس وارد شده براساس قانون تفرق مندل به نسل بعد نیز منتقل گردید (۴۶). با این وجود، ژن‌های رتروویروسی منتقل‌شده در جنین‌ها و نیز موش‌های متولدشده بیان نشدند. توالی‌های راه‌انداز (Promoter) و تسریع‌کننده (Enhancer) رتروویروس‌ها و نواحی انتهایی طویل (Long Terminal Repeats) باعث تحریک فاکتورهای اپی‌ژنی سلول میزبان در غیرفعال‌کردن ترانس‌ژن از طریق متیلاسیون توالی راه‌انداز ویروسی و نیز راه‌اندازهای ژن‌های سلول میزبان که در مجاورت محل واردشدن رتروویروس قرار دارند، می‌شود (۴۷). با توجه به اینکه هایپرمتیلاسیون در جنین‌های مرحله قبل از لانه‌گزینی اتفاق می‌افتد، اگر جنین‌های مرحله بعد از لانه‌گزینی را آلوده به ویروس کنیم، هایپرمتیلاسیون این ژن‌ها انجام نمی‌شود (۴۸).

خاموش‌شدن ترانس‌ژن‌های ویروسی خاص یک گونه نبوده و در تمامی مطالعات گزارش شده‌است (۴۹) و به همین دلیل یکی از ضعف‌های انتقال‌ژن از طریق رتروویروس‌هاست.

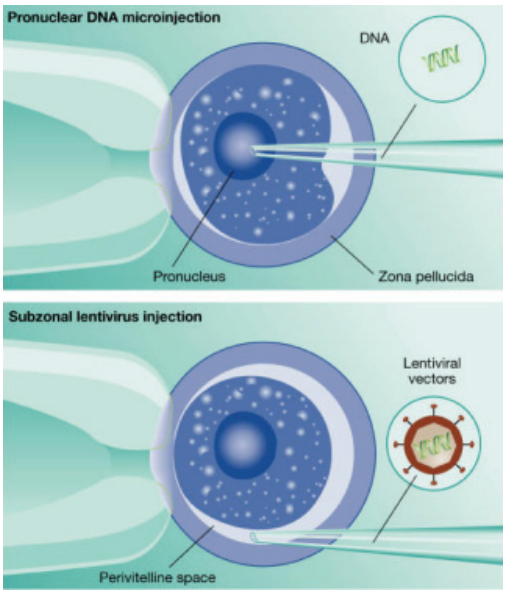
لنتی‌ویروس‌ها (Lentiviruses) دسته‌ای از خانواده رتروویروس‌ها بوده که ژنوم و مورفولوژی آن‌ها پیچیده‌تر از دیگر رتروویروس‌هاست (۵۰).لنتی‌ویروس‌ها از حیوانات مختلفی نظیر گوسفند، گاو، اسب، گربه و انسان جدا شده‌اند که معروفترین آنها ویروس HIV انسانی است (۵۱). لنتی‌ویروس‌ها دارای شباهت‌های زیادی با رتروویروس‌ها هستند. تمامی آن‌ها دارای سه ژن Env, Pol, Gag می‌باشند که به ترتیب کدکننده ساختار پروتئین داخلی، آنزیم رونویسی کننده معکوس و پوشش گلیکوپروتیئنی هستند (۵۲). علاوه بر این ژن‌ها، لنتی‌ویروس‌ها دارای ژن‌های دیگر نظیر tat و rev بوده که سیکل زندگی و سازگاری آنها را با محیط پیچیده‌تر می‌کند (۵۳). پس از ورود لنتی‌ویروس به داخل سلول میزبان، RNA ژنومی ویروس با رونویسی معکوس تبدیل به DNA شده و به داخل ژنوم سلول میزبان وارد می‌شود. مهم‌ترین تفاوت رتروویروس‌ها با لنتی‌ویروس‌ها در این است که رتروویروس‌ها برای ورود خود نیاز به تقسیم سلول میزبان دارند و فقط برای ترانس‌فکشن سلول‌هایی به‌کار برده می‌شود که در زمان انتقال‌ژن، فعالانه تقسیم گردند. درحالی‌که لنتی‌ویروس‌ها فعالانه خود وارد ژنوم سلول میزبان شده و نیازی به تقسیم سلول ندارند (۵۴).

حامل‌های ویروسی را می‌توان به دو دسته واردشدنی و وارد نشدنی تقسیم کرد. ژنوم حامل‌های واردنشدنی نظیر آدنوویروس‌ها، درحین تقسیم‌های سلولی در طی مراحل تکامل حذف می‌شوند.

به همین دلیل فقط از دسته واردشدنی برای انتقال‌ژن استفاده می‌شود. حامل‌های ویروسی واردشدنی از سه دسته رتروویروس‌ها، لنتی‌ویروس‌ها و آدنوویروس‌های‌وحشی (دارای پروتئین Rep هستند) مشتق شده‌اند. مراحل ایجاد حامل‌های ویروسی به طور خلاصه بدین صورت است: مشخص کردن ژن‌های ویروسی لازم برای تکثیر ویروس و ایجاد اجزای لازم برای ورود به سلول میزبان، حذف تمامی ژن‌های ویروسی و جایگزین‌کردن ترانس‌ژن مورد نظر با آن‌ها و ایجاد اجزای ویروسی است که بتوانند ژنوم حامل را وارد ژنوم سلول میزبان کنند (۵۳). با حذف ژن‌های لازم جهت رشد و تکثیر ویروس، ژنوم ویروسی توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهد و فقط وارد ژنوم همان سلول‌های اولیه می‌شود.

اولین حامل لنتی‌ویروسی از HIV-1 مشتق شد و پس از آن حامل‌های دیگر تولید گردید. امروزه نسل سوم این حامل‌های ویروسی به صورت تجاری تولید شده‌است. برای ایجاد امنیت و نیز جلوگیری از آلودگی احتمالی در هنگام استفاده از آنها (به خصوص احتمال زیاد وارد شدن آنها به داخل نواحی ژن‌های سرطان‌زای سلولی و به دنبال آن سرطانی شدن سلول‌های بدن میزبان)، حامل‌های لنتی‌ویروسی طراحی شده‌اند که توالی‌های راه‌انداز، تسریع‌کننده و نواحی انتهایی طویل آنها حذف شده‌اند. این حامل‌ها را حامل‌های خود غیرفعال (Self Inactivating; SIN) گویند (۵۳). استفاده از حامل‌هایی دارای راه‌انداز غیرفعال، ممکن است مانع فعال‌شدن سیستم هایپرمتیلاسیون از طرف سلول میزبان شده و مانع از خاموش‌شدن ترانس‌ژن شود. به دلیل غیرفعال شدن راه‌انداز ویروسی، لازم است از راه‌اندازهای دیگری نظیر CMV، PGK و CAG استفاده شود تا ترانس‌ژن بتواند بیان شود (۵۴، ۵۵).

در این روش ویروس‌ها به زیر فضای زوناپلوسیدا و چسبیده به غشای سلول تخم و یا تخمک بالغ شده که در مرحله متافاز ۲ تقسیم میوزی بوده و فاقد غشای هسته است، تزریق می‌شوند. شکل ۲ نحوه تزریق مواد ژنتیکی را در دو روش MI و VI مقایسه می‌کند.



شکل ۲: نحوه تزریق مواد ژنتیکی در دو روش ریزتزریق و انتقال از طریق ویروس‌ها (۵۰)

نسبت جنین‌های تراریخته به جنین‌های تزریق‌شده در موش و خوک به ترتیب برابر ۲۲ و ۱۳ درصد و نسبت نتاج تراریخته به کل نتاج متولدشده به ترتیب برابر ۷۷ و ۷۰ درصد بود (۵۶). در اولین تحقیقی که بر روی گاو با استفاده از حامل‌های رتروویروسی انجام شد، از ۲۰ جنین منتقل شده ۳ گوساله ایجاد شد که فقط یک گوساله زنده مانده. تمامی سه گوساله متولدشده دارای ترانس‌ژن مورد نظر بودند ولی بیان ترانس‌ژن در هیچ‌کدام از آن‌ها انجام نشد (۴۹). سپس در سال ۲۰۰۱ محققین توانستند با همین روش میمون تراریخته را ایجاد کنند که بیان ترانس‌ژن GFP در تمامی سلول‌های آن مشاهده شد (۵۷). از آن به بعد استفاده از این روش برای ایجاد پستانداران تراریخته به عنوان یک روش جایگزین روش ریزتزریق افزایش یافت و با ایجاد نسل‌های جدیدتر حامل‌های لنتی‌ویروسی که نرخ ورود و بیان زیادتری داشتند، استفاده از این روش رایج‌تر شد (۵۸).

مهم‌ترین عیب استفاده از لنتی‌ویروس‌ها در مقایسه با سایر روش‌ها محدودیت اندازه ترانس‌ژن مورد استفاده است. حداکثر ظرفیت یک حامل ویروسی بر مبنای HIV تقریبا ۱۰ کیلوباز است که با در نظرگرفتن اندازه نواحی طویل‌انتهایی مورد استفاده (۱/۵ کیلوباز، حداکثر اندازه ترانس‌ژن ۸/۵ کیلوباز می‌باشد (۵۴).

انتقال‌ژن از طریق اسپرم (Sperm Mediated Gene Transfer; SMGT)

اولین آزمایش موفق ترانس‌فکت گامت‌ها توسط براکت و همکاران با استفاده از اسپرم خرگوش انجام شد (۵۹). سپس ارزو ترانس‌فکشن اسپرماتوزوآی توتیای دریایی (Sea Urchin Sperm) را گزارش کرد (۶۰). در همان سال یک مقاله جالب، ایجاد خوک‌های تراریخته را با استفاده از ترانس‌فکت اسپرماتوزوآ با بازدهی زیاد گزارش نمود (۶۱). بر خلاف گزارش‌های اولیه مبنی بر موفقیت‌آمیزبودن این روش، تاریخچه اولیه انتقال ژن از طریق اسپرم با مشکل عدم تکرارپذیری همراه بود و به‌همین دلیل با انتقادهای زیادی مواجه بوده است. لازم به ذکر است که گزارش عدم موفقیت این روش توسط برینستر و همکارانش در مجله Cell و اندکی پس از انتشار مقاله لاویترانو و همکارانش در همان مجله به چاپ رسید (۶۲). آنها این آزمایش را با استفاده از اسپرم‌های ۶ نوع لاین مختلف از موش و ترانس‌ژن‌های دارای اندازه‌های مختلف از ۴/۸ تا ۹/۳ توسط آنها و از ۴/۳ تا ۱۴ کیلوباز توسط محققین در آزمایشگاه‌های دیگر و نیز با یک ساعت انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن، توانستند ۸۸۴ و ۱۶۴۴ جنین را در آزمایشگاه‌های مختلف ایجاد کنند. بر خلاف نتایج لاویترونا و همکاران در هیچ‌کدام از جنین‌های ایجاد شده، ترانس‌ژن مورد نظر یافت یا بیان نشد (۶۲). با این وجود در سال‌های بعد گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده موفقیت‌آمیز از این روش منتشر شد. علی‌رغم انتقادات و مشکلات اولیه این روش، انتقال‌ژن از طریق اسپرم کم‌کم به یک روش مؤثر در ایجاد حیوانات تراریخته معرفی شد و پیش‌بینی می‌شود که جایگزین مناسبی برای روش تزریق به داخل پیش هسته باشد.

پری و همکاران ابتدا اسپرم‌ها را منجمد سپس ذوب کرده و در معرض دترجنت تریتون قرار دادند. نفوذپذیری غشای سلولی اسپرم‌ها تغییر کرده و ترانس‌فکت اسپرماتوزوآ انجام شد. آن‌ها اسپرم‌ها را به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق کردند و توانستند تعداد زیادی حیوان تراریخته را ایجاد کنند (۶۳).

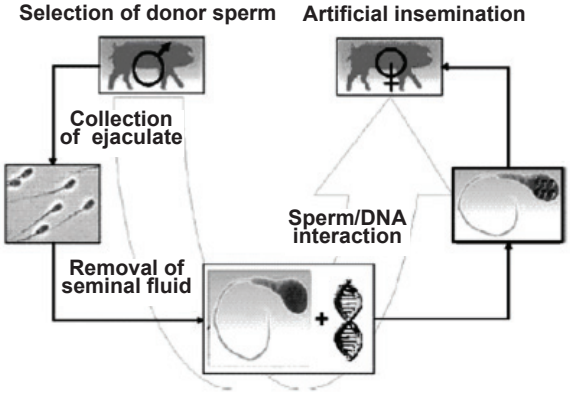
لاویترانو و همکاران با بررسی سه گروه مختلف پروتئین‌های

موجود در سطح سلول‌های اسپرم، مکانیسم اتصال DNA خارجی به سلول‌های اسپرم را بررسی کردند. گروه پروتئین‌های ۳۵-۳۰ کیلودالتونی تنها گروهی بودند که در بین گونه‌های مختلف پستانداران خاصیت الکتروفورتیک (Electrophoretic) خود را حفظ کرده و توانایی اتصال به DNA خارجی راداشتند. در مایع انزال پستانداران، گروهی از گلیکوپروتئین‌ها که غلظت آنها بسیار زیاد است، ممانعت‌کننده اتصال DNA خارجی به اسپرم بوده که فاکتور ممانعت کننده (Inhibitory Factor) نامیده می‌شود. این فاکتور ممانعت کننده، توانایی جذب DNA خارجی توسط سلول‌ها، که از طریق پروتئین‌های ۳۵-۳۰ کیلودالتون انجام می‌شود، را مهار می‌کند. بنابراین تداخل اسپرم و DNA خارجی یک پدیده تصادفی نبوده و براساس مکانیسم‌های مولکولی پروتئین‌های خاص انجام می‌شود (۶۴).ترشحات کیسه سمینال و دیگر غدد ضمیمه دارای خاصیت DNase بسیار قوی بوده که از دیگر عوامل ممانعت‌کننده انتقال‌ژن از طریق اسپرم محسوب می‌شوند. افزودن EDTA یا حرارت‌دادن ترشحات غدد ضمیمه باعث حذف خاصیت DNase آن‌ها می‌شود. برای حذف این ممانعت‌کننده‌ها، شستشوی کامل اسپرم یک مرحله ضروری است (۶۵).

آنها در یک مطالعه دیگر، مکانیسم تاثیر دو دسته گیرنده‌های سطوح سلولی به نام‌های Cytoplasmic Dependent (CD-4) و Major Histocompatibility Complex Class (MHC-II) را در اتصال و جذب DNA خارجی به اسپرم موش بررسی کردند. اتصال DNA به اسپرم موش‌های فاقد ژن MHC-II نسبت به اسپرم موش‌های تیپ وحشی ۵۰ درصد کاهش یافت، ولی نرخ جذب DNA خارجی به داخل اسپرم در هر دو نوع اسپرم مشابه بود. بنابراین، بیان ژن MHC-II در اتصال DNA خارجی به سلول اسپرم نقش دارد. مقایسه اسپرم موش‌های فاقد ژن CD4 و اسپرم موش‌های تیپ وحشی نشان داد که ملکول‌های CD4 در اتصال DNA به اسپرم نقشی ندارد، ولی در واردشدن آن‌ها به داخل اسپرم نقش اساسی دارد. اسپرم موش‌های فاقد ژن CD4، توانایی جذب ترانس‌ژن را نداشته ولی در تیپ وحشی جذب DNA انجام گرفت (۶۶). مولکول‌های Cluster of Differentiation (CD4) از دسته ایمونوگلوبین‌ها و از جنس گلیکوپروتئین‌ها هستند که بر روی سطح سلول‌های T helper، سلول‌های T regulatory، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریت بیان می‌شوند. سلول‌های T که بر روی سطح آن‌ها CD4 بیان می‌شود، محل اختصاصی برای اتصال آنتی‌ژن MHCII محسوب می‌شود (۶۷).

لاویترانو و همکارانش توانستند ژن DAFh را با موفقیت به خوک منتقل کرده و خوک‌های تراریخته را ایجاد کنند. در ۸۰درصد از موارد، ترانس‌ژن وارد ژنوم خوک‌ها شده و در ۶۴درصد از خوک‌های حاوی ترانس‌ژن، بیان پایدار آن انجام شده بود. این مطالعه نشان داد که SMGT یک روش بسیار موفق در انتقال‌ژن به خوک بوده که بازدهی آن نسبت به تمامی روش‌های دیگر زیادتر، مراحل انجام کار ساده‌تر و هزینه کمتری نیز داشته است (۶۸).

آن‌ها در مطالعه دیگری معیارهای لازم را برای انتخاب حیوان نر، دهنده اسپرم بررسی کردند. اسپرم حیوان نر می‌بایست دارای کیفیت بالایی باشد؛ یعنی از نظر حجم مایع انزال، درصد تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های نرمال و غلظت سلول‌های اسپرم در مایع انزال مطلوب باشد و همچنین توانایی زیادی در جذب DNA خارجی داشته باشد. بین توانایی جذب DNA و کیفیت اسپرم (به‌خصوص میزان تحرک اسپرم) رابطه مستقیمی وجود دارد(۶۹). بااین‌وجود، نتایج مطالعات در گاو(۷۰) و خوک(۷۱) نشان داد که بین حیوانات دهنده اسپرم، از نظر میزان و درصد جذب ترانس‌ژن، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. توانایی جذب DNA از طریق اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است. این توانایی در اسپرم خوک‌ها بسیار زیادتر از موش‌ها گزارش شده‌است (۷۱). یکی از دلایل این اختلاف را می‌توان در ابعاد مختلف سر اسپرم و ناحیه پشت آکروزومی که محل اتصال DNA خارجی به اسپرم است، در نظر گرفت (۷۲).



شکل ۳: مدل شماتیک مراحل انتقال‌ژن از طریق اسپرم با استفاده از تلقیح مصنوعی (۶۴)

نتایج نشان می‌دهد که افزایش تعداد کپی‌های ترانس‌ژن در هر اسپرم باعث فعال‌شدن اندونوکلئازهای داخل اسپرم شده که منجر به شکستن ترانس‌ژن و برخی نواحی ژنوم میزبان شده و به دنبال آن سبب مرگ اسپرم‌های ترانس‌فکت شده خواهد شد (۷۳).

یکی دیگر از عوامل مؤثر بر بازدهی انتقال‌ژن از طریق اسپرم، توالی ترانس‌ژن مورد استفاده نیز هست. استفاده از دو نوع پلاسمید با طول یکسان (۷/۵ کیلوباز) که هر دو دارای ژن hGH ولی با راه‌اندازهای متفاوت بوده، بقای جنینی و نرخ انتقال‌ژن کاملا متفاوتی را سبب شده است (۷۲). در دو مطالعه دیگر، استفاده از یک توالی کوچک غیرقابل رونویسی، موجب افزایش بازدهی انتقال‌ژن ونیز بیان ترانس‌ژن در مرغ (۷۳) و گاو (۷۴) شد. در مطالعه دیگری از دو نوع پلاسمید که از نظر اندازه (Size)، راه انداز (Promoter) و تسریع کننده (Enhancer) مشابه بوده و فقط از نظر ترانس‌ژن متفاوت بودند، برای ترانس‌فکشن اسپرم گاو استفاده شد. نتایج نشان داد که تاثیر توالی ترانس‌ژن بر بازدهی ترانس‌فکشن اسپرم غیر معنی‌دار بوده است. جمع‌بندی نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که نوع راه‌انداز و تسریع‌کننده بر بازدهی انتقال‌ژن از طریق اسپرم مؤثر بوده در حالی که نوع و اندازه ترانس‌ژن از اهمیت چندانی برخوردار نبوده است (۷۵).

بازدهی انتقال‌ژن از روش انتقال‌ژن از طریق اسپرم، از ۱۲/۵ درصد در گاو (۷۶) تا ۸۸ درصد در خوک (۷۷)گزارش شده است. علاوه‌بر تفاوت‌های بین گونه‌ای، از دیگر عوامل بسیار موثر در این زمینه متفاوت بودن نسبت اسپرم به ترانس‌ژن و نیز حجم محیط انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن است (۷۲). نتایج منتشرنشده مؤلفین این مقاله نشان داد که افزایش حجم محیط انکوباسیون بر تعداد کپی‌های ترانس‌ژن وارد شده به داخل اسپرم، به شدت موثر بوده است (۷۸).

برای افزایش بازدهی ترانس‌فکشن اسپرم از تکنیک‌های مختلفی نظیر لیپوفکشن (۷۷)، الکتروپوریشن (۷۸) ، تزریق حامل‌های ویروسی به داخل سیتوپلاسم تخمک (۷۹)، ترانس‌فکشن اسپرم با استفاده از حامل‌های ویروسی (۶۳) تزریق ترانس‌پوزان‌ها به داخل سیتوپلاسم تخمک (۸۰) و تزریق آنزیم Recombinase به داخل سیتوپلاسم تخمک (۸۱) استفاده شده‌است. لازم به ذکر است که در روش SMGT بر خلاف روش حامل‌های ویروسی، اندازه ترانس‌ژن یک عامل محدودکننده نبوده و ترانس‌ژن‌های با طول بیش از ۲۰۰ کیلوباز نیز با موفقیت به جنین موش منتقل شده اند(۸۲).

نتیجه‌گیری

بر خلاف آن که تکنیک ریز تزریق، دارای بازدهی کم در حیوانات اهلی است ولی به دلیل سادگی انجام کار و عدم نیاز به نیروی کار زیاد، هنوز هم به عنوان یک تکنیک موثر به خصوص در انتقال‌ژن به موش استفاده می‌شود. برای برطرف‌کردن این عیب در انتقال‌ژن به سایر حیوانات بزرگ‌تر، سعی شده است از ترکیب تکنیک‌های حامل‌های ویروسی، ریزتزریق و انتقال‌ژن از طریق اسپرم به‌صورت تزریق حامل‌های لنتی‌ویروسی به فضای زیر زونا، انکوباسیون با جنین‌های عاری از زونا و یا انکوباسیون اسپرم با لنتی‌ویروس‌ها استفاده شود. استفاده از لنتی‌ویروس‌ها برای افزایش بازدهی ریز تزریق تا حدود زیادی موفق بوده و توانست بازدهی انتقال‌ژن در خوک و گاو را به ترتیب به ۷۰ و ۱۰۰ درصد برساند که در ۶۴ و ۱۰۰ درصد از آن‌ها بیان ترانس‌ژن انجام شد (۸۳). با این وجود، این تکنیک دارای عیب‌های متعددی از جمله نرخ مرگ ومیر بالای جنین‌ها، ایجاد موزاییک، امکان ایجاد آلودگی توسط این ویروس‌ها، امکان عدم انتقال ترانس‌ژن به نسل بعد و محدودبودن اندازه ترانس‌ژن مورد استفاده می‌باشد. تکنیک دیگر مورد استفاده برای افزایش بازدهی انتقال‌ژن و نیز حذف نرخ موزاییک، انتقال هسته سلول‌های بدنی است. در این روش تمامی سلول‌ها دارای مواد ژنتیکی یکسانی بوده که میزان بیان ترانس‌ژن و نیزجنس حیوان ایجاد شده قابل تعیین است. برای انجام این تکنیک نیاز به ایجاد لاین سلولی بوده که ترانس‌ژن مورد نظر به طور دایم وارد ژنوم آن‌ها شده و بیان آن نیز در سطح مطلوبی انجام شود. یکی دیگر از روش‌هایی که بازدهی زیادی داشته و به سادگی قابل انجام است، انتقال‌ژن از طریق اسپرم است. در اغلب مقالات مروری، این روش را به عنوان بهترین جایگزین برای روش ریزتزریق معرفی کرده‌اند؛ هر چند بازدهی این روش در موش و خوک بسیار بالا گزارش شده ولی تلاش برای افزایش بازدهی آن در گاو با استفاده از دیگر تکنیک‌ها نظیر لیپوفکشن، ترانس‌پوزان‌ها و الکتروپوریشن در حال انجام است.

References

1. Houdebine LM. Animal Transgenesis and cloning. New York: John Wiley and Sons pub; 2003.
2. Houdebine LM. Animal transgenesis: recent data and perspectives. Biochimie. 2002; 84: 1137-1141
3. Maga EA, Cullor JS, Smith W, Anderson GB, Murray JD. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3(4): 384-392.
4. Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr Mz, Barney DJ, et al. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nat, Biotechnol. 2001; 19: 741-745.
5. Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. J Dairy Sci. 1997; 80: 2213-2224.
6. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nat. Biotechnol. 2003; 21: 157-162.
7. Noble MS, Rodriguez-Zas S, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine α-lactalbumin in their milk. J Anim Sci. 2002; 80: 1090-1096.
8. Maga EA, Shoemaker CF, Rowe JD, Bon Durant RH, Anderson GB, Murray JD. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. J Dairy Sci. 2006; 89:518-524.
9. Damak S, Su H, Jay NP, Bullock DW. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. Biotechnology. 1996; 14: 185-188.
10. Pursel VG, Wall RJ, Mitchell AD, Elsasser TH, Solomon M.B, Coleman ME, et al. Expression of insulin-like growth factor-I in skeletal muscle of transgenic pigs. In: Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin MM, editors. Transgenic animals in agriculture. New York: CABI Publishing, 1999.
11. Lai LX, Kang JX, Li RF, Wang JD, Witt WT, Yong HY, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. Nat Biotechnol. 2006; 24: 435-436.
12. Houdebine LM. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. J Biotechnol. 2002; 98 (2-3): 145-160.
13. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. PNAS. 1980; 77: 7380-7384.
14. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature. 1985; 315: 680-683.
15. Rexroad CE Jr, Hammer RE, Bolt DJ, Mayo KE, Frohman LA, Palmiter RD, et al. Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. Mol Reprod Dev. 1989; 1(3): 164-169.
16. Wilmut I, Hooper ML, Simons JP. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. J Reprod Fertil. 1991; 92(2): 245-279.
17. Wall RJ. Pronuclear microinjection. Cloning Stem Cells. 2001; 3(4): 209-220.
18. Wall RJ, Paleyanda RK, Foster JA, Powell A, Rexroad C, Lubon H. DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments. Anim Biotechnol. 2000; 11(1): 19-32.
19. DePamphillis ML, Herman SA, Martinez-salas E, Chalifour LE, Wirak DO, Copo DY, et al. Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. Biotechniques. 1988; 6; 662-680.
20. Bondioli KR, Biery KA, Hill KG, Jones KB, DeMayo F. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. In: First N, Haseltine F (editor). Transgenic Animals.

London: Butterworth-Heinemann; 1991; P: 265-272.
21. Bishop Jo, Smith P. Mechanism of chromosome integration of microinjected DNA. Mol Biol Med. 1989; 6: 283-298.
22.Giraldo p, Montoliu L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. Transgenic Research. 2001; 10: 83-103.
23. Pieper Fr, DeWit IC, Pronk AC, Kooiman PM, Strijker R, Krimpenfort PJ, et al. Efficient generation of functional transgenesis by homologous recombination in murine zygotes. Nucleic acid research. 1992; 20: 1259-1264.
24. Kupriyanov S, Zeh K, Baribault H. Double pronucei DNA injection into zygotes increases yields of transgenic mouse lines. Transgenic Research. 1998; 7: 223-226.
25. Schiestl RH, Petes TD. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in Saccharomyces cerevisiae. Proc Nat1 Acad Sci USA. 1991; 88: 7585-7589.
26. Seo BB, Kim CH, Yamanouchi K, Takahashi M, Sawasaki T, Tachi C, et al. Co-injection of restriction enzyme with foreign DNA into pronucleos for elevating production efficiencies of transgenic animals. Animal reproduction science. 2000; 63: 113-122.
27. Kang YK, Park JS, Lee CS, Yeom YI, Han YM, Chung AS, et al. Effect of short interspersed element sequences on the integration and expression of a reporter gene in the preimplantation-stage mouse embryos. Mol Reprod Dev. 2000; 56: 366-371.
28. Rieth A, Pothier F, Gagne M, Sirard MA. Use of bovine satellite sequences to increase transgene integration by homologous recombination in bovine embryos. Mol Reprod Dev. 1999; 53: 1-7.
29. Ghaedi K, Kawai K, Okumoto K, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, et al. Isolation and characterization of novel peroxisome biogenesis-defective Chinese hamster ovary cell mutants using green fluorescent protein. Experimental Cell Research. 1999; 248: 489-497.
30. Spemann H. Embryonic Development and Induction. New York: Hafner Publishing Co; 1938.
31. Briggs R, King TJ. Trasplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. Proc Natl Acad Sci USA. 1952; 38: 455-461.
32. Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. J Embryol Exp Morph. 1975; 34: 93-112.
33. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science 1983; 220: 1300-1302.
34. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature. 1986; 320: 63-65.
35. Campbell K. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. J Anat. 2002; 200: 267-275.
36. Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza, R. P. The health profile of cloned animals. Nat Biotech. 2002; 20: 13-14.
37. Betthauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. Nat Biotech. 2000; 18(10): 1055-1059.
38. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 1997; 385(6619): 810-813.
39. Ashtiani K, Nasr-Esfahani MH, Hosseini M, Moulavi F, Hajian M, Frouzanfar M, et al. Royana: Successful Experience in Cloning the Sheep. Yakhteh. 2008; 10(3): 193-200.
40. Frouzanfar M, Nasr-Esfahani MH, Rezazadeh M, Parivar K, Moulavi F, Hosseini M, et al. Comparison of ovary cumulus cells and ear fibroblast cells efficacies in developmental stage in implantated Sheep cloned fetus. Iranian Antomic Sci Magazine. 2007; 18: 1-8.
41. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science. 1997; 278: 2130-2133.
42. McCreath KJ, Howcroft J, Cambell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nat Biotech. 2000; 405 (6790): 1066-1069.
43. Bosch P, Hodges CA, Stice SL. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. Biotecnología Aplicada. 2004; 21: 128-136.
44. Pfiefer A. Lentiviral transgenesis. Transgenic Research. 2004; 13: 513-522.
45. Jaenisch R, Fan H, Croker B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. PNAS. 1975; 72: 4008-4012.
46. Jaenisch R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. PNAS. 1976; 73: 1260-1264.
47. Jahner D, Jaenisch R. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. Nature, 1985; 315: 594-597.
48. Jahner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Lohler J, Simon I, et al. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. Nature. 1982; 298: 623-628.
49. Chan AWS, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel DR. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 14028-14033.
50. Fässler R. Lentiviral transgene vectors. EMBO. 2004; 5(1): 28-29.
51. Desrosiers RC. Nonhuman lentiviruses. In: Howley PM, Knipe DM, Griffin D, Lamb RA, Martin A, Roizman B, Straus SE (editors). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 2001.
52. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol Cell Biol. 1990; 10(8): 4239-42.
53. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. J Virol. 1998; 72: 8150-8157.
54. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. Nat Genet. 2000; 25: 217-222.
55. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science. 2002; 295: 868-872.
56. Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. EMBO. 2003; 4: 1054-1060.
57. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-San-

tos J, Simerly CR, Hewitson L, et al. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. Mol Hum Reprod. 2000; 6: 26-33.
58. Kurita K, Burgess SM, Sakai S. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. PNAS. 2004; 101(5): 1263-1267.
59. Brackett BG, Baranska W, Sawichi W, and Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. PNAS. 1971; 68: 353-357.
60. Arezzo F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. Cell Biol Int Rep. 1989; 13: 391-394.
61. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell. 1989; 57: 717-723.
62. Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. Cell. 1989; 59: 239-241.
63. Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science. 1999; 284: 1180-1183.
64. Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, et al. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. Exp Cell Res. 1995; 217(1): 57-64
65. Lavitrano M. Sperm-mediated gene transfer. Rep Fert Develop. 2006; 18: 19-23.
66. Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, et al. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. Exp Cell Res.1997; 233(1): 56-62.
67. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF (editors). Leucocyte typing. Berlin: Springer-Verlag; 1986.
68. Cappello F, Stassi G, Lazzereschi D, Renzi L, Di Stefano C, Marfé G, et al. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. Transplant Proc. 2000; 32(5): 895-896.
69. Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, et al. Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Mol Reprod Dev. 2003; 64(3): 284-91.
70. Anzar M, Buhr MM. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. Theriogenology. 2006; 65: 683-690.
71. García-Vázquez F, Gumbao D, Gutiérrez-Adan A. Gadea J. Use of flow cytometry to evaluate the capacity of boar sperm to bind to exogenous DNA of different sizes. Reprod Fertil Dev. 2007; 19(1): 316-316.
72. Sciamanna I, Piccoli S, Barberi L, Zaccagnini G, Magnano AR, Giordano R, et al. DNA dose and sequence dependence in spermmediated gene transfer. Mol Reprod Dev. 2000; 56: 301-305.
73. Rottmann OJ, Antes R, Hofer P, Maierhofer G. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. J Anim Breed Genet. 1991; 109: 64-70.
74. Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Bracket BG, Tesfaye D, Jennen D, et al. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect of transfection reagent and DNA architecture. Theriogenology. 2007; 67(6): 2097-207.
75. Alderson J, Wilson B, Laible G, Pfeffer P, Huillier PL. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. Anim Reprod Sci. 2006; 91: 23-30
76. Webster N, Forni M, Bacci M, Giovannoni R, Razinni R, Fantinati P, et al. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. Mol Reprod Dev. 2005; 72: 68-76.
77. Eghbalsaied SH, Ghaedi K, Hosseini M, Tanhayii S, Forouzanfar M, Hajian M, et al. Selection of the Most Appropriate Medium for Assessing Motility and DNA Uptake of Bovine Spermatozoa. Yakhteh. 2008; 10(4): 266-271.
78. Rieth A, Pothier F, Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. Mol Reprod Dev. 2000; 57: 338-345.
79. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly C R, Hewitson L, et al. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. Mol Hum Reprod. 2000; 6: 6-33.
80. Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S.Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. Biol Reprod. 2005; 73(6): 1157-1163.
81. Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology. 2005; 64: 1704-1715.
82. Osada T, Toyoda A, Moisyadi S, Akutsu H, Hattori M, Sakaki Y, et al. Production of inbred and hybrid transgenic mice carrying large (>200 kb) foreign DNA fragments by intracytoplasmic sperm injection. Mol Reprod Dev. 2005; 72(3): 329-335.
83. Park P. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? Physiol Genomics. 2007; 31: 159-173.