DOI: 10.22092/vj.2019.125297.1558
شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تولید حیوانات تراریخت با بهره مندی از فناوری‌های نوین تولید مثل: میکرواینجکشن و الکتروپوریشن و انتقال هسته

• نوید داداش‌پور دواچی (نویسنده مسئول)
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و رسم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۱-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۲-۰۲

Email: navid.d.davachi@gmail.com

چکیده

فناوری‌های تولید حیوانات تراریخت به عنوان یکی از زمینه‌های تحقیقاتی در شاخه زیست‌فناوری به حساب می‌آید که در دهه‌ی اخیر از سرعت رشد بسیار زیادی برخوردار شده است. حیوانات تراریخت در حقیقت نوعی از حیوانات هستند که به‌واسطه پیشرفت و ترکیب روش‌های نوین تولید برون تنی رویان و مهندسی ژنتیک، حامل قطعه‌ای از ژنوم موجودی از گونه جانوری دیگر یا انسانی هستند. شایان ذکر است که صرفا به واسطه‌ی انتقال ژن و یا ژن‌هایی از یک گونه به گونه‌ای دیگر، نمی‌توان ادعا نمود که حیوان تراریخت تولید شده است. در حقیقت پس از افزودن ماده ژنتیکی جدید به ژنوم موجود پذیرنده می‌بایست توانایی انتقال آن ژن به نسل بعد در حیوان پذیرنده ایجاد شده باشد و همچنین محصول بیانی آن ژن نیز می‌بایست به شکل کامل و به صورتی که عملکرد فیزیولوژیک آن ژن حفظ شده باشد قابل شناسایی و استحصال باشد. در این مقاله مروری به بررسی مهمترین روش های استفاده شده در تولید حیوانات تراریخته پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: حیوان تراریخت، مدل‌های حیوانی، الکتروپوریشن، میکرواینجکشن

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 13-19

Production of transgenic animal: Microinjection, electroporation, and nuclear transfer

By: Dadashpour Davachi, Navid., (Corresponding Author) Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-02-11 **Accepted: 2019-04-22**

Email: navid.d.davachi@gmail.com

The technology of transgenic animals' production is one of the areas of research in the biotechnology branch, which has a very fast growth rate in the last decade. To current knowledge, several methods have been developed for the production of transgenic animals such as microinjection of the desired genetic structure into the male pre-core in Zygote, gene transfer using embryonic stem cells transmission to the embryos during the blastocyst stage, gene transfer by sperm and using the new and workable CRISPER/Cas9 method. The key to success in the production of transgenic animals is the optimization of gene transfer method and the exact expression of the transmitted gene. A number of new technologies have been presented in the field of gene transfer in recent decades, which have reduced both research and production costs and improved the speed and delicacy of transmission processes. In the present review the most common methods in the production of transgenes would be discussed.

Key words: Transgenic Animal, Animal Model, Electroporation, Micro-injection

مقدمه

استفاده از حیوانات تراریخت و دستکاری شده ژنتیکی در تحقیقات زیست شناختی، واکسن سازی، داروهای نو ظهور، شناخت ساز و کار برخی بیماری‌ها با منشا ژنتیکی و یا انواع سرطان امری ضروری و تا به امروز بدون جایگزین به حساب می‌آید. همچنین شناسایی عملکرد و کنش هر یک از فرآوردهای حاصل از بیان ژن در بدن موجودات و پیاده سازی نقشه راه روندهای حیاتی از جمله تکوین رویان موجودات در دوره پیش از لانه‌گزینی به‌منظور تکمیل دانشنامه‌ی چگونگی آغاز روند خلقت تمام موجودات زنده از دیگر کاربردهای فناوری تولید حیوانات تراریخت به حساب می‌آید. همچنین از منظر تولید حیوانات مقاوم به انواع بیماری‌ها و یا تولید حیواناتی با ویژگی‌ها و شاخص‌های عملکردی و تولیدی بیشتر از پتانسیل ذاتی آن‌ها نیز از جمله کاربردهایی دیگر برای تولید حیوانات تراریخت به حساب می‌آید. روش‌های متعددی تا به امروز برای تولید حیوانات تراریخت توسعه یافته است که از آن جمله می‌توان به میکروواینجکشن ساختار ژنتیکی مورد نظر به پیش هسته نر در زایگوت، انتقال ژن با استفاده از انتقال سلول‌های بنیادی جنینی دستکاری شده به رویان در مرحله بلاستوسیت، انتقال ژن به واسطه‌ی اسپرم، و استفاده از روش نوین و کاربردی CRISPER/Cas9 اشاره نمود. کلید موفقیت در تولید حیوانات تراریخت، بهینه بودن روش انتقال ژن و بیان دقیق ژن انتقال یافته است. فناوری‌های متعدد و جدیدی در راستای انتقال ژن و شبیه سازی حیوانات مدل در دهه‌های اخیر معرفی شده است که هم هزینه‌های تحقیقاتی و تولیدی را کاهش داده است و هم سرعت عمل و دقت فرایندهای انتقال را بهبود بخشیده است.

روش‌های تولید حیوانات تراریخت

همان‌طور که ذکر شد روش‌های متعددی در زمینه تولید حیوانات تراریخت تاکنون توسعه یافته است. که در ادامه به آن‌ها پرداخته خواهد شد.

ریزتزریق در پیش هسته زایگوت

اولین حیوان تراریخت در دهه ۷۰ میلادی به واسطه تزریق DNA به پیش هسته نر رویان در مرحله ابتدایی پس از لقاح موفقیت آمیز و تشکیل پیش هسته‌ها تولید شد (۱). در این روش، پس از تولید ژن یا ژن‌های مورد نظر و قرار دادن آن‌ها تحت کنترل پروموتور خاص و مشخص، اقدام به تزریق مجموعه ژنتیکی بیگانه به پیش هسته نر در رویان می‌نمایند. در ادامه و پس از کشت رویان به مدت هفت الی هشت ساعت در انکوباتور و حصول اطمینان از زنده بودن رویان اقدام به انتقال رویان به لوله تخم بر یا رحم مادرهای جایگزین می‌نمایند. این‌که رویان به اویداکت منتقل شود یا شاخ رحم بستگی به مرحله‌ای از تکامل رویان دارد که محقق در آن مرحله قصد انتقال را دارد. چنان‌چه در همان گامه پیش هسته قصد انتقال را داشته باشند رویان به اویداکت و چنانچه در گامه بلاستوسیست قرار باشد انتقال صورت پذیرد انتقال به یکی از شاخ‌های رحم و یا هر دو

شاخ رحم انجام می‌شود. در این روش قطعه ژنوم خارجی با الگوی کاملا تصادفی در ژنوم میزبان وارد می‌شود. مشخص شده است که استفاده از این روش در گونه‌هایی مانند بز (۲)، گوسفند، خوک و خرگوش بیشترین بازده را دارد (۳). نکته قابل توجه اینجاست که استفاده از این روش در گونه‌هایی که محتوای لیپیدی اووسیت آن‌ها غنی‌تر است از جمله گاو با مشکل و افت بازده روبرو است که دلیل نهایی آن به عدم توانایی در مشاهده پیش هسته نر و شناسایی موقعیت آن جهت تزریق است (۴). درصد موفقیت تولید حیوانات تراریخت با استفاده از این روش در رت و موش خرگوش در حدود ۳٪ و در گاو و خوک و گوسفند کمتر از ۱٪ است (۳). استفاده از این روش منجر به نرخ بالایی برای تولید پدیده موزایکی می‌شود که در آن سلول‌های حیوانات تولید شده در برخی از بافت‌ها و نقاط بدن حامل قطعه ژنوم بیگانه و سایر سلول‌ها فاقد آن می‌باشند. یکی از محدودیت‌های تولید حیوانات ترارخیت با این روش محدودیت در تعیین ممزوج شدن کامل قطعه ژنوم خارجی با ژنوم موجود پذیرنده و توانایی انتقال بین نسل‌های بعدی موجود است، زیرا در دام‌های بزرگ زمان انتظاری در حدود دو الی سه سال لازم است تا نتاج جدید بالغ شوند و توانایی تولید مثل پیدا کنند و قابل ارزیابی شوند. از دیگر مشکلات تولید حیوانات تراریخت با این روش این است که نرخ بالایی از تغییر در بیان قطعه ژن و یا ژنوم خارجی به دلیل نرخ بالای پدیده‌ی موزاییکی شدن حیوان و تاثیر محلی از ژنوم که قطعه جدید به آن اضافه شده است بر ژن یا ژن‌های خارجی افزوده شده در ژنوم، مشاهده می‌شود (۵). به منظور حصول اطمینان از این‌که لاین حیوانات تراریخت تولید شده است یا خیر لازم است که لاین‌های مختلف از این حیوانات مورد سنجش از نظر بیان قطعه ژن یا ژن های خارجی افزوده شده به ژنوم پذیرنده قرار بگیرند که بسیار هزینه بر و وقت گیر است. موارد مذکور در بالا از جمله معایب روش ریزتزریق در پیش هسته رویان آغازین در تولید حیوانات تراریخت در مدل حیوانات بزرگ مانند نشخوارکنندگان به حساب می‌آید، اما استفاده از این روش در حیوانات کوچک مانند جوندگان می تواند گزینه مناسبی برای تولید مدل‌های تراریخت باشد.

تولید حیوانات تراریخت با استفاده از سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی جنینی جمعیتی از سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که توانایی تولید هر سه لایه اندودرم، اکتودرم و مزودرم را در دوران جنینی دارند. این سلول‌ها از جمعیت سلولی درونی (Inner Cell Mass: ICM) موجود در بلاستوسیست منشا گرفته و به طور وسیعی در تولید حیوانات تراریخت، به ویژه موش‌های تراریخت، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در شرایط بهینه‌ی کشت این سلول‌ها تمایل دارند که به صورت بی پایان تقسیم شوند.به دلیل همین ویژگی این سلول‌ها قابلیت دستکاری شدن و حفظ توانایی بقا و تقسیم پس از انتقال DNA حاوی ژن(های) بیگانه را دارند، به این منظور ابتدا ICM به عنوان منبع سلول‌های بنیادی جنینی از بلاستوسیست خارج شده و سپس در شرایط برون‌تنی کشت داده می‌شوند پس از کشت ژن(های) با منشا خارجی به آن‌ها منتقل می‌شود. سپس سلول‌های بنیادی تراریخت از سلول‌های بنیادی غیرتراریخت مجزا شده و برای ادامه کشت انتخاب می‌شوند تا کلنی سلول‌های بنیادی جنین تراریخت تولید شود. سپس از این کلنی تعداد مشخصی از لول‌ها برداشته شده و به رویان در مرحله بلاستوسیست منتقل می‌شوند و در ادامه این بلاستوسیست برای ادامه روند تکوین به بدن مادران جایگزین منتقل می‌شوند. سپس حیوانات کایمر به دنیا آمده به منظور اطمینان از ورود ژن(های) خارجی به سلول‌های جنسی حیوان ارزیابی می‌شوند و پس از انتخاب حیوان مورد نظر از روش‌های متنوع نسل گیری برای تولید حیوان تراریخت خالص استفاده می‌شود. مزیت اصلی این روش نسبت به روش ریز تزریق ماده ژنتیکی انتخاب آگاهانه انتقال ژن(های) بیگانه به واسطه‌ی مارکرهایی است که در روش میکرواینجکشن امکان استفاده از آن‌ها وجود ندارد(۶). استفاده از این روش برای تولید حیوانات مزرعه‌ای تراریخت به دلیل مشکل بودن شرایط کشت و سختی ایجاد شرایط کشتی که مانع از تمایز سلول‌های بنیادی شود کار را سخت و غیرقابل قبول می‌نماید. همچنین به دلیل فاصله نسل طولانی در این گونه از حیوانات و هزینه‌بر بودن نگهداری حیوانات کایمر تولید شده با این روش به منظور ایجاد کلنی خالص مسائله دیگری است که کار تولید را سخت‌تر می کند.

انتقال ژن به واسطه‌ی اسپرم

گزارش‌های متعددی وجود دارد که در آن‌ها به این نکته اشاره شده است که می‌توان از اسپرم به عنوان یک وکتور برای انتقال ژن به داخل اوسیت به جای دستگاه میکرواینجکشن استفاده نمود. در اوایل دهه ۷۰ میلادی کشف شد که سلول‌های اسپرم این توانایی را دارند که بتوانند DNA با منشا خارجی را حمل نمایند و با این ترتیب در هنگام انجام پدیده لقاح این ماده ژنتیکی با منشا بیگانه را به داخل اووسیت منتقل نمایند (۷). پس از این کشف، این توانایی اسپرم به عنوان توانایی ارزشمند به منظور تولید حیوانات تراریخت مورد استفاده قرار گرفت. در این روش اسپرم به همراه قطعه DNA بیگانه که دارای ژن(های) مورد نظر می‌باشد برای مدت ۳۰ دقیقه و به همراه محلول‌های ویژه در انکوباتور قرار می‌گیرد در این شرایط اسپرم با کمک پروتئین‌های سطحی موجود بر سطح غشاء پلاسمایی اسپرم قطعه DNA را به اصطلاح می‌پذیرد و به این ترتیب امکان انتقال آن پس از لقاح به درون اووسیت را فراهم می‌نماید (۸). در حدود ۱۵ الی ۲۰ درصد از DNA متصل شده به اسپرم به واسطه ملکول CD4 به داخل اسپرم کشیده می‌شود (۹)، به منظور نهایی شدن انتقال ژن به واسطه اسپرم به اووسیت و در نتیجه به نسل بعد روش‌های متعددی از جمله لقاح برون تنی، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، لقاح با روش لاپاراسکوپی مورد استفاده قرار گفته است که نتایج نشان‌دهنده برتری روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم در انتقال ژن به واسطه اسپرم است. در سال ۲۰۱۱ نشان داد شده که با استفاده از روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم ۹۱٫۶٪ از رویان‌هایی که ژن GFP را بیان می‌نمودند با استفاده از این روش تولید شد(۱۰) همچنین Perry و همکاران با استفاده از روش تزریق درون سیتوپلاسمی اووسیت در گاو نرخ پایین موفقیت انتقال با این روش را گزارش نمودند. مطالعات در راستای بهبود شرایط تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم دارای قطعه خارجی DNA در گونه‌های مختلف حیوانی صورت گرفت و طی آن مشخص شد که پس از تزریق اسپرم دارای DNA بیگانه به اووسیت در مرحله متافاز ۲ لازم است که اووسیت به واسطه تحریک شیمیایی فعال شود (۴, ۱۱). پس از بهره بردن از محلول‌های فعال سازی شیمیایی متفاوت مشخص شد که نرخ

موفقییت در تولید بلاستوسیت‌هایی که بیان کننده GFP باشند به ۸۰٪ رسید (۱۲). یکی از برتری‌های امیدوارکننده‌ی این روش امکان تولید حیوانات تراریخت به تعداد بسیار بالا و با سرعت بیشتر است در حالی‌که کمترین نیاز به دستکاری رویان در این روش مشاهده می‌شود. در حقیقت هم به‌صورت درون‌تنی و هم به صورت برون تنی امکان تولید حیوانات تراریخت در این روش وجود دارد.البته در این روش نیز همانند روش ریزتزریق DNA به پیش هسته رویان امکان هدایت انتقال ژن به مکان دلخواه وجود ندارد و برخلاف انتقال ژن به واسطه سلول‌های بنیادی جنینی این روش نیز از نرخ بالایی در تولید حیوانات کایمر ناخالص و بروز پدیده موزاییک رنج می‌برد (۴).

انتقال هسته سلول‌های سوماتیک

انتقال هسته سلول‌های سوماتیک به سیتوپلاسم اووسیت در گامه متافاز ۲ که هسته و محتویات ژنتیکی آن تخلیه شده است به عنوان روشی برای تولید موجود کاملا مشابه با موجود دهنده هسته استفاده می‌شود. شبیه‌سازی از طریق انتقال هسته منجر به تولید حیوانات برتر با صفات کمی و کیفی مورد نظر و همچنین تولید حیوانات تراریخت به منظور استفاده در کشاورزی و علوم پزشکی می‌شود. نرخ موفقیت تولید حیوانات تراریخت با استفاده از این روش ۱-۳٪ ذکر شده است. از مزایای این روش در تولید حیوانات تراریخت این است که در این روش امکان پیش بینی جنسیت موجود و برنامه‌ریزی‌های استراتژیک آینده به ویژه در صنعت دامپروری وجود دارد. در عین حال یکی از اشکالات این روش درصد مرگ و میر زیاد جنین‌های حاصل از این روش می‌باشد (۱۳). عوامل متعددی در بازده روش انتقال هسته به اووسیت بی‌هسته موثر می‌باشد که شامل نوع سلول اهداکننده هسته (۴, ۱۴)، روش بی‌هسته‌سازی اووسیت (۱۵)، روش و مراحل الکتروفیوژن و فعال‌سازی مجدد اووسیت پس از انتقال هسته (۱۶, ۱۷) است. هر یک از مراحل فوق الذکر به‌طور مختصر در زیر توضیح داده شده است.

نوع سلول و شرایط کشت برون تنی سلول اهدا کننده هسته

تاکنون سلول‌های متعددی به عنوان سلول اهدا کننده هسته مورد استفاده قرار گرفته‌اند که شامل سلول فیبروبلاست جنینی و بالغ، سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های مغزی، اسپرم، سلول‌های بیضه، سلول‌های مثانه، سلول‌های کومولوس، سلول‌های سرتولی، ماکروفاژ، لوکوسیت‌های خونی، و سلول‌های بنایدی جنینی می‌باشند (۱۸-۲۳). اما تاکنون مشخص نشده است که کدام نوع از سلول بهترین گزینه به عنوان اهداکننده هسته برای انجام انتقال هسته است(۲۱, ۲۳, ۲۴). همچنین همانطور که پیش تر ذکر شد شرایط کشت سلول اهداکننده هسته نیز در بازده روش انتقال هسته موثر می‌باشد، زیرا سلول اهدا کننده هسته پیش از انجام عملیات اهدا می‌بایست برای مدتی در شرایط برون تنی و در انکوباتور کشت داده شود(۲۴-۲۶). در سال ۲۰۱۴ تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین قدرت تکوین رویان‌های گاوی حاصل از انتقال هسته با استفاده از سلول‌های کومولوس که تحت شرایط مختلف کشت برون تنی از جمله کشت بدون سرم، سلول‌های کشت نیافته انجام شد نتایج این تحقیقات مشخص نمود که رویان حاصل از انتقال هسته سلول‌های کومولوس کشت داده شده و سلول‌های کومولوس کشت نیافته بیشترین توانمندی را در سپری نمودن مراحل تکوین از خود بروز دادند (۲۷-۲۹). مطالعات مشابهی در رت و بز نیز انجام شد (۳۰, ۳۱). مطالعات متعددی در این زمینه انجام شد که در نهایت نشان دادند که استفاده از سلول‌هایی که دورهای کشت کوتاه مدت و یا بلند مدت را سپری نموده اند و در مرحله‌ی پیری به سر می‌برند به منظور انتخاب به عنوان اهدا کننده‌ی هسته مناسب‌تر می‌باشند و این توانایی را دارند فرایند برنامه ریزی مجدد سلولی را سپری نمایند و در نهایت بتوانند نتاج کلن شده‌ی سلامتی را پس از انتقال هسته تولید نمایند(۳۲).

مرحله چرخه سلولی اووسیت گیرنده‌ی هسته

هماهنگی چرخه سلولی اهدا کننده هسته و اووسیت پذیرنده‌ی هسته بسیار پر اهمیت می‌باشد، زیرا این هماهنگی منجر به پیشگیری از بروز آسیب به DNA و همچنین حفظ وضعیت نرمال پلوئیدی کروموزوم‌ها می‌شود (۳۳, ۳۴). معمولا از اووسیتی که در مرحله متافاز ۲ متوقف شده است به عنوان بهترین پذیرنده‌ی هسته استفاده می‌شود (۳۵). همچنین مرحله چرخه سلولی که اهدا کننده هسته در آن مرحله قرار دارد نیز از دیگر عوامل تاثیرگذار در کیفیت رویان تولید شده و توانایی تکوین آتی آن می‌باشد.سلول‌های در مرحله G0 و G1 چرخه سلولی به عنوان بهترین اهدا کنندگان هسته در تمامی مطالعات موفق معرفی شده‌اند (۲۴). همچنین گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان از موفقیت اووسیت‌های در مرحله متافاز ۲ به عنوان گیرنده هسته در تولید موفقیت‌آمیز نتاج پس از انتقال هسته و تشکیل رویان دارد (۲۳). مطالعات مقایسه‌ای صورت گرفته به منظور تمیز قایل شدن بین اینکه اهدا کننده‌ی هسته در مرحله G0 و مرحله G1 کدام یک توانمندی بالاتری در تشکیل موفقیت‌آمیز رویان دارند حاکی از توانمندی مشابه سلول‌های فیبروبلاست در مرحله G0 و G1 بود (۲۱, ۳۶-۳۸). در پاره ای از مطالعات نتایج چیز دیگری را نشان می‌داد که شامل برتری سلول‌های فیبروبلاست G1 به عنوان اهدا کننده هسته در قیاس با G0 بود (۲۱, ۳۴, ۳۶-۴۰).

فعال‌سازی اووسیت

برخلاف رویه لقاح برون تنی که فعال‌سازی اووسیت پس از ورود اسپرم به‌صورت خود به خودی انجام می‌شود در انتقال هسته سوماتیک به اووسیت به منظور تولید موجود شبیه سازی شده/تراریخت می‌بایست حتما پس از انتقال هسته اووسیت به صورت الکتریکی یا شیمیایی فعال شود. در فعال‌سازی اووسیت از یونوفر کلسیم A23187، اتانول، و ۳ فسفاتیدیل اینوزیتول و کلرین استرانسیوم استفاده می‌شود). مطالعات نشان داده است که تمامی این روش‌ها منجر به افزایش غلظت کلسیم درون سلولی شده که درنهایت منجر به بازسازی ساختار رویان و فعال سازی روند تکوین می‌شود (۳۹, ۴۱, ۴۲). تولید حیوانات تراریخت با کمک روش انتقال هسته سلول‌های سوماتیک به عنوان روشی چند مرحله ای به حساب می‌آید که شامل عوامل تاثیرگذار فنی و بیولوژیک بر توانایی تکوین رویان حاصل از انتقال هسته می‌باشد. علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در بهبود شرایط تولید رویان های حاصل از روش انتقال هسته

سوماتیک همچنان بازده این روش بسیار پایین می‌باشد. دلیل عمده این نرخ پایین موفقیت عدم توانایی رویان تولید شده در بازبرنامه‌ریزی ژنوم هسته‌ی انتقال داده شده می‌باشد (۴۳).

رویکردهای نوین در ویرایش ژنوم

تا اینجا به ارایه نتایج تحقیقاتی پرداخته شد که به وارد نمودن ژن(های) بیگانه و یا هسته سلول سوماتیک به سیتوپلاسم سلول/اووسیت/ و یا رویان می‌پرداخته‌اند. اما نکته مهم این است که این قطعه ژن(های) بیگانه می‌بایست به داخل ژنوم سلول پذیرنده وارد شوند تا بتوانند در نهایت تولیدکننده حیوانات تراریخت باشند، این امر مهم‌ترین مسله در تولید حیوانات تراریخت به حساب می‌آید. بنابراین توسعه دانش و روش‌هایی که بتوانند موضوع وارد شدن ژن(های) بیگانه به ژنوم موجود پذیرنده را تسهیل نماید امری مهم در تحقیقات و تولید حیوانات تراریخت محسوب می‌شود. Zinc Finger Nuclease یا (ZFN)، کریسپر، و TALEN به عنوان تکنولوژی‌های نوین کمکی در تولید حیوانات تراریخت از نوکلئازها ریکامبینازها و اینتگرازها، که از موجودات پست‌تر از جمله باکتری‌ها استخراج شده‌اند، که البته در پستانداران به خوبی فعالیت می‌نمایند استفاده می‌کنند. این عوامل اجازه افزودن ژن(های) خارجی را به‌صورت اختصاصی در قسمت ویژه‌ای از ژن فراهم می‌نمایند. هر کدام از این تکنولوژی‌ها به صورت مختصر در ادامه توضیح داده می‌شود.

Zinc Finger Nuclease

Zinc Finger Nuclease (ZFN) از یک قسمت متصل شونده به DNA و یک اندونوکلئاز غیر اختصاصی تشکیل شده است. این مجموعه توانایی شناسایی و اتصال به ناحیه مشخصی از DNA را به واسطه‌ی دامنه متصل شونده خود دارد، پس از برقرار شدن این اتصال اندونوکلئاز غیر اختصاصی موجود در ساختار ZFN دو رشته DNA مورد نظر را برش می‌دهد و در ادامه به واسطه سازوکار Homology Direct Repair یا non-Homology Direct Repair ورود و ادقام قطعه DNA با منشا خارجی با ژنوم موجود پذیرنده انجام می‌شود (۴۱). استفاده از روش ZFN در موش و رت و انسان درصد زیادی از موفقیت را نشان داده است. البته مثال‌هایی از موفقیت این روش در دام‌های بزرگ نیز وجود دارد که از آن جمله می‌توان به تولید گاوهای تراریخت که به بیماری ورم پستان مقاوم هستند نیز اشاره کرد(۴۴). البته این روش تولید حیوانات تراریخت به دلیل محدودیت روش ZFN در راستای اتصال به DNA ژنوم هدف که مربوط به محتوای آن قسمت از DNA می‌باشد استفاده از ZFN را برای ایجاد تغییر در تمام نقاط ژن محدود می‌نماید (۴۵). همچنین نقص در اتصال اختصاصی برخی قسمت‌های ZF می‌تواند منجر به ایجاد اتصال و شکاف در ژنوم موجود پذیرنده در جایی غیر از ناحیه اختصاصی مورد نظر شود. که این امر منجر به تولید جهش ناخواسته و نقص‌های کروموزومی شود (۴۶, ۴۷).

کریسپر (CRISPER)

کریسپر Cas9 به عنوان جدیدترین دستاورد بیوتکنولوژی تولید حیوانات تراریخت از سال ۲۰۰۹ به دنیای بیوتکنولوژی معرفی شد و جایگزین خوبی برای روش‌های مرسوم که پر هزینه و پیچیده‌تر بودند شد (۴۸). سیستم کریسپر از سیستم ایمنی و دفاعی باکتری‌ها استخراج شده و برای ویرایش هدفمند ژنوم بازطراحی و آماده شده است. این سیستم شامل یک توالی RNA می‌باشد که به عنوان توالی هدایتگر شناخته می‌شود. این توالی در حقیقت مکمل منطقه‌ای از ژنوم میزبان است که مورد نظر به منظور ویرایش است. جزء مهم و تعیین کننده دیگر سیستم کریسپر پروتئین Cas است که توانایی برش تک رشته DNA هدف در ژنوم موجود مورد نظر را دارا می‌باشد. برای استفاده از سیستم کریسپر روش‌های متفاوتی بکار می‌رود که شامل میکروواینجکشن، و الکتروپوریشن است. به این منظور سازه کریسپر مورد نظر طراحی شده و به واسطه‌ی یکی از روش‌های انتقال ذکر شده به درون رویان در در مرحله پس از لقاح وارد می‌شود. از دیگر مزیت‌های نسبی این روش امکان ویرایش نقص‌های ژنتیکی مادرزادی حتی پس از تولد موجود می‌توان اشاره نمود که در حال حاضر در مراکز تحقیقاتی و مطالعاتی معتبر دنیا این امر در دستور کار قرار دارد (۴۸).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب ذکر شده و با درنظر داشتن این نکته که هر یک از روش‌های مذکور دارای مزایا و معایب خاص خود هستند به نظر می‌رسد که در انتخاب روش مناسب به‌منظور تولید حیوانات تراریخت چند عامل را می‌بایست درنظر گرفت که به ترتیب شامل موارد زیر است: ۱) گونه حیوان مورد مطالعه ۲) تجهیزات و مواد مصرفی لازم ۳) نیروی انسانی متخصص ۴) هدف از تولید حیوانات مدل "به عنوان مثال چنانچه هدف تولید حیوانات با ژن یا ژن‌های ناک اوت شده می‌باشد بهتر است از روش کریسپر که کم هزینه‌تر و آسان‌تر است استفاده شود"

با درنظر داشتن همه جوانب در راستای بکارگیری تکنولوژی‌های نوین تولیدمثلی و بیوتکنولوژی و با توجه به نیاز کمتر روش تولید حیوانات تراریخت با استفاده از روش کریسپر به تجهیزات گرانقیمتی همچون دستگاه میرواینجکشن به نظر می‌رسد که آینده ی تولید حیوانات مدل که از نظر ژنتیکی دستکاری شده‌اند در اختیار فن آوری کریسپر یا روشی مشابه آن قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و براساس پروژه مصوب ۲۱۸۱۸۰۳۸۹۶۰۵۹۵ انجام شده است.

منابع مورد استفاده

1. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(12):7380-4.

2. Freitas VJ, Serova IA, Andreeva LE, Dvoryanchikov GA, Lopes ES, Jr., Teixeira DI, et al. Production of transgenic goat (Capra hircus) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*.

2007;79(4):585-92.
3. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad Jr CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.* 1985;315(6021):680.
4. Salamone D, Bevacqua R, Hiriart M, Buemo C, Luchetti C, Moro L, et al. Transgenesis in farm animals. *Anim Reprod*. 2012;9(4):772-6.
5. Bosch P, Hodges CA, Stice SL. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotecnología Aplicada.* 2004;21(3):128-36.
6. Hodges CA, Stice SL. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E. 2003;1:81.
7. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1971;68(2):353-7.
8. 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(5):717-23.
9. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays.* 1998;20(11):955-64.
10. Pereyra-Bonnet F, Gibbons A, Cueto M, Sipowicz P, Fernandez-Martin R, Salamone D. Efficiency of sperm-mediated gene transferin the ovine by laparoscopic insemination, in vitro fertilization and ICSI. *The Journal of reproduction and development.* 2011;57(2):188-96.
11. Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, Olivera R, Jarazo J, Vichera G, Gibbons A, et al. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, fertility, and development.* 2008;20(7):741-9.
12. Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, Salamone DF. High rates of bovine blastocyst development afterICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology*. 2010;74(6):922-31.
13. Kishigami S, Wakayama S, Hosoi Y, Iritani A, Wakayama T. Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome. *Experimental cellresearch.* 2008;314(9):1945-50.
14. Oback B, Wells DN. Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Molecular reproduction and development.* 2007;74(5):646-54.
15. Moro L, Vichera G, Olivera R, Salamone D. Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación. *InVet.* 2010;12(2):195-204.
16. Canel N, Bevacqua R, Fernandez-Martin R, Salamone DF. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cellular reprogramming.* 2010;12(4):491-9.
17. Vichera G, Alfonso J, Duque CC, Silvestre MA, Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, et al. Chemical activation with a combination of ionomycin and dehydroleucodine for production of parthenogenetic, ICSI and cloned bovine embryos. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene.* 2010;45(6):e306-12.
18. Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respess DS, Tumlin M, Stice SL. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biology of reproduction.* 2002;66(6):1768-74.
19. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature biotechnology.* 1998;16(7):642-6.
20. George A, Sharma R, Singh KP, Panda SK, Singla SK, Palta P, et al. Production of cloned and transgenic embryos using buffalo (Bubalus bubalis) embryonic stem cell-like cells isolated from in vitro fertilized and cloned blastocysts. *Cellular reprogramming.* 2011;13(3):263-72.
21. Goto Y, Hirayama M, Takeda K, Tukamoto N, Sakata O, Kaeriyama H, et al. Effect of synchronization of donor cells in early G1-phase using shake-off method on developmental potential of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 2013;84(8):592-9.
22. Huang B, Cui K, Li T, Wang X, Lu F, Liu Q, et al. Generation of buffalo (Bubalus bubalis) transgenic chimeric and nuclear transfer embryos using embryonic germ-like cells expressing enhanced green fluorescent protein. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2010;45(1):103-8.
23. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biology of reproduction*. 2001;64(1):324-30.
24. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*. 1998;282(5396):2095-8.
25. Cho J, Bhuiyan MM, Shin S, Park E, Jang G, Kang S, et al. Development potential of transgenic somatic cell nucleartransfer embryos according to various factors of donor cell. *The Journal of veterinary medical science*. 2004;66(12):1567-73.
26. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves

following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of reproduction.* 1999;60(4):996-1005.

27. Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in Cattle. *The Journal of reproduction and development*. 2014;60(5):329-35.

28. Akagi S, Takahashi S, Adachi N, Hasegawa K, Sugawara T, Tozuka Y, et al. In vitro and in vivo developmental potential of nuclear transfer embryos using bovine cumulus cells prepared in four different conditions. *Cloning and stem cells.* 2003;5(2):101-8.

29. DadashpourDavachi N, Zare Shahneh A, Kohram H, Zhandi M, Shamsi H, Hajiyavand AM, et al. Differential influence of ampullary and isthmic derived epithelial cells on zona pellucida hardening and in vitro fertilization in ovine. *Reproductive Biology*. 2016;16(1):61-9.

30. Akshey YS, Malakar D, De AK, Jena MK, Garg S, Dutta R, et al. Hand-made cloned goat (Capra hircus) embryos-a comparison of different donor cells and culture systems. *Cellular reprogramming.* 2010;12(5):581-8.

31. Cervera RP, Garcia-Ximenez F. Oocyteage and nuclear donor cell type affect the technical efficiency of somatic cloning in rabbits. *Zygote*. 2003;11(2):151-8.

32. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*. 2000;288(5466):665-9.

33. Campbell KH, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction.* 2003;61:477-94.

34. Dadashpour Davachi N, Fallahi R, Dirandeh E, Liu X, BartlewskiPM. Effects of co-incubation with conspecific ampulla oviductal epithelial cells and media composition on cryotolerance and developmental competence of in vitro matured sheep oocytes. *Theriogenology*. 2018;120:10-5.

35. Oback B, Wells DN. Cloning cattle. *Cloning and stem cells*. 2003;5(4):243-56.

36. Ideta A, Hayama K, Urakawa M, Tsuchiya K, Aoyagi Y, Saeki K. Comparison of early development in utero of cloned fetuses derived from bovine fetal fibroblasts at the G1 and G0/G1 phases. *Animal reproduction science*. 2010;119(3-4):191-7.

37. Ideta A, Urakawa M, Aoyagi Y, Saeki K. Early development in utero of bovine nuclear transfer embryos using early G1 and G0 phase cells. *Cloning and stem cells.* 2007;9(4):571-80.

38. Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2001;19(12):1176-8.

39. Dadashpour Davachi N, Kohram H, Zainoaldini S. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research.* 2012;102(1):37-42.

40. Zeinoaldini S, Jafari Z, Sarmast F, Torbati E, Dadashpour Davachi N. Different Harvesting Techniques Used in Ovine in vitro Embryo Production. *Scimetr.* 2013;1(1):e87326.

41. Miao X. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013;70(5):815-28.

42. Dadashpour Davachi N, Kohram H, Zare Shahneh A, Zhandi M, Goudarzi A, Fallahi R, et al. The effect of conspecific ampulla oviductal epithelial cells duringin vitro maturation on oocyte developmental competence and maturation-promoting factor (MPF) activity in sheep. *Theriogenology.* 2017;88:207-14.

43. Rodriguez-Osorio N, Urrego R, Cibelli JB, Eilertsen K, Memili E. Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology.* 2012;78(9):1869-86.

44. Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, et al. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc R Soc B*. 2014;281(1780):20133368.

45. Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Muller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods*. 2008;5(5):374-5.

46. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods*. 2011;8(9):765-70.

47. Radecke S, Radecke F, Cathomen T, Schwarz K. Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. *Mol Ther.* 2010;18(4):743-53.

48. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology.* 2013;31(7):397-405.