مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 2، پاییز و زمستان 1389)

روش های تولید پرندگان تراریخت و کاربرد آنها در زیست فناوری

محمد رضا نصیری[1]، شاهرخ قوّتی *[2]، محمد رضا محمدآبادی[3]، حمید آریان نژاد[2]، محمد دوستی[2]

[1] دانشیار گروه علوم دامی و پژوهشکده بیوتکنولوژی و فناوری زیستی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فرودوسی مشهد

[2] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[3] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1388/12/13، تاریخ پذیرش: 1390/02/07

چکیده

طی چند دهه گذشته توانایی ایجاد تغییرات مستقیم ژنتیکی در سطح ملکولی انقلاب عظیمی را در علم زیست شناسی بوجود آورده است. فناوری موجود در تراریخت‌ها، امکان پیوند تکنیک‌های مختلف را در زمینه-های جنین شناسی، بیولوژی سلولی و ژنتیک ملکولی فراهم کرده است. امروزه پرندگان تراریخت به عنوان ابزارهای تحقیقاتی مفید و مؤثر در بسیاری از مؤسسات مورد استفاده قرار می‌گیرند. بسیاری از دانشمندان معتقدند که قبل از تحقیق در این مورد، ابتدا باید روش‌های تولید پرندگان تراریخت متداول شوند. با توجه به پیشرفت چشمگیر علم زیست فناوری، دستکاری مستقیم جنین به وسیله DNA و یا حامل‌های ویروسی امکان پذیر شده است. اما به طور عموم، این روش‌ها توانایی ایجاد جایگاه اختصاصی برای دستکاری ژنوم را ندارند. برای رفع این مشکل، اخیراً روش های مختلفی برای تولید جوجه های تراریخت بر پایه استفاده از سلول‌های بلاستودرم (BDCS)، سلول‌های بنیادی جنین (ESCs)، سلول‌های زایای بدوی (PGCS) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (SSCs) پیشنهاد شده و توسعه یافته است. لذا سیستمی کامل برای جداسازی، تکثیر، آلوده کردن، انتخاب و تکثیر مجدد محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی و به دنبال آن تولید میزان بالایی شمیر سوماتیک بهبود داده شده و نتایج آن در مقالات جدید علمی گزارش شده است. نشان داده شده که روش کشت بیضه‌ای سلول های اسپرماتوگونیال جدیدترین، ساده‌ترین و پربازده‌ترین روش تولید جوجه‌های تراریخت در طی سالهای اخیر بوده است. در این روش از SSCsها به عنوان القاگر در مراحل بیولوژیکی تولید اسپرم برای ایجاد جوجه های تراریخت استفاده می شود. اگرچه استفاده از سیستم‌های ویروسی می‌تواند باعث انتقال ژن با بازدهی بالا شوند، اما مسائل ایمنی موجود، کاربرد عملی آن‌ها را محدود کرده است. در حال حاضر برای ایجاد پرندگان تراریخت از ترکیب روش‌های تولید سلولهای زایای شیمر و دستکاری سلولی بنیادی پرتوان نیز استفاده می‌شود. در این مقاله سعی شده مهمترین روش‌های تولید جوجه‌های تراریخت، روش‌های انتقال ژن و همچنین کاربرد جوجه‌های تراریخت به عنوان راکتور زیستی در زیست فناوری تشریح شود.

کلمات کلیدی: *جوجه‌های تراریخت، انتقال ژن، دستکاری ژنتیکی، سلول‌های پر توان، حامل‌های ویروسی، سلولهای بنیادی.*

* نویسنده مسئول: شاهرخ قوّتی تلفن: 0511 8795618 E. Mail:Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در طی دهه گذشته تحقیقات انجام شده در زمینه‌های داروشناسی، پزشکی، ژنتیک، کشاورزی و مهندسی داروهای زیستی در اکثر کشورهای پیشرفته نیاز به تولید حیوانات تراریخت را اثبات نموده اند. وجود مزیت‌های تکنیکی قابل توجه در پرندگان سبب شده با وجود گزینه‌های مختلف برای تولید پروتئین‌های نوترکیب[1]، جوجه‌های تراریخت[2] به عنوان منبع تجاری مهمی برای تولید مورد توجه قرار گیرند. این مزیت‌ها شامل موارد زیر است: 1-دوره رشد کوتاه (متوسط 5 ماه درمرغ‌سانان[3])، 2- ردیابی جوجه‌های حاوی ژن انتقال یافته در مدت کوتاه تر (Lillico et al., 2005)، 3- تولید بیشتر ژن انتقال یافته (خروس بارور می‌تواند هر سه روز به ازای ده مرغ منی تولید کند، هر مرغ گیرنده می‌تواند بعد از لقاح ده تخم زایا تولید کند و مرغان بالغ ماده سالانه در حدود 330 تخم تولید می‌کنند) و 4- ساختار ساده پروتئین‌های تخم که به شکل معنی داری در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تاثیر مثبت دارد (Dunn et al., 2005). لذا، پرندگان به سبب هزینه تولید کمتر، محیط استریل طبیعی تخم و تولید مقدار زیاد پروتئین در تخم گزینه‌های مناسبی برای تولید پروتئین‌های درمانی در صنعت داروسازی هستند (Dunn et al., 2005). اگرچه در بیست سال گذشته موش‌های تراریخت بیشتر برای انجام تحقیقات تجاری مورد توجه بوده‌اند، اما تکنولوژی تولید جوجه‌های تراریخت نیز همزمان با پستانداران رشد کرده است. اولین موش تراریخت را Gordon et al., (1980) با استفاده از تکنیک انتقال ژن به پیش هسته[4]، ایجاد کردند. با وجود محدودیت‌هایی همچون انتقال تصادفی و جهش در قطعه انتقال داده شده، که سبب کاهش راندمان تولید تراریخت‌ها می‌شدند، تزریق به پیش هسته به عنوان پرکاربردترین فناوری تولید تراریخت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Ono et al., 1994). تفاوت‌های معنی دار مانند روند عبور تخم از اویداکت، نیاز به پوسته برای رشد و دشواری جداسازی سلول‌های زایا یا بنیادی جنین پرندگان که در سیستم‌های تولیدمثلی گونه‌های پرندگان نسبت به پستانداران وجود دارد، باعث شد که محققین روش‌های متفاوتی را برای تولید پرندگان تراریخت مورد استفاده قرار دهند. در گزارشات قبلی به دو روش عمده برای تولید پرندگان تراریخت اشاره شده است که به دو روش مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می‌شوند. در روش مستقیم، جنین با استفاده از DNA و یا حامل‌های ویروسی دستکاری می‌شود. روش‌های غیر مستقیم مختلفی بر پایه سلولی، برای تولید جوجه‌های تراریخت

1 Recombinant protein

2 Transgene chickens

3 *Gallus gallus*

4 Pronucleus

Archive of SID

www.SID.ir

توسعه یافته‌اند، که در آن‌ها به طور عمده از سلول-های بلاستودرم[5] (BDCS)، سلول‌های بنیادی جنین[6] (ESCs)، سلول‌های زایای بدوی[7] (PGCS) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال[8] (SSCs) استفاده می شود. محققین برای تولید موفقیت آمیز حیوانات تراریخت دو اصل مهم را در نظر گرفته اند. اول این که آن‌ها سعی نمودند که سلول-های هدف در حیوانات مختلف را بدون کاهش در قابلیت زیستی سلول به طور مؤثری دستکاری کنند و دوم این که دستکاری ژن هدف سبب تغییر عملکرد نرمال ژن نشود. هدف از این مقاله مروری بر انواع روش های انتقال ژن در پرندگان و میزان موفقیت و کارایی این روش ها در بیان ژن و تولید پروتئین های نوترکیب در پرندگان تراریخت و کاربرد آنها در زیست‌فناوری می‌باشد.

روش‌های مستقیم

در مطالعات اولیه، پژوهشگران تلاش کردند که با استفاده از روش‌های مرسوم در پستانداران، پرندگان تراریخت را تولید کنند. محققان در این روش‌ها سعی نمودند با تزریق DNA به پیش هسته تخم، پرنده تراریخت ایجاد کنند (Love et al., 1994; Sherman et al., 1998). استفاده از این روش‌ها علاوه بر پر هزینه بودن مسایلی را بوجود آوردند، که استفاده از آن‌ها را دشوار می‌کرد. برای به دست آوردن هر تخم، پرنده‌های بالغ می‌باید ذبح می‌شدند. لذا، تعداد مناسب و کافی تخم برای تولید پرندگان تراریخت بدست نمی‌آمد. همچنین این روش‌ها به مهارت-هایی ویژه‌ای نیاز دارند، زیرا پس از هر تزریق، تخمک باید در خارج از بدن موجود زنده کشت داده شود یا به پرنده ماده دیگری منتقل شود تا نهایتاً یک پرنده زنده متولد شود که هر دوی این روش‌ها به سطح قابل توجهی از مهارت‌های تکنیکی و زیر ساختی برای انجام سیستم کشت خارج از بدن موجود زنده، نیاز دارند. محققان تلاش کردند با دستکاری مستقیم جنین در دو مرحله اساسی رشد این دو مشکل مهم را از بین ببرند. آنها نشان دادند مرحله بلاستودرم (مرحله X)، تخم تازه بارور شده زمان مناسبی برای قرار دادن جنین دستکاری شده می باشد (Han, 2009). همچنین انکوبه کردن جنین به مدت 72 ساعت، سبب قابل دسترس شدن سلول‌های زایای بدوی می‌شود که از این سلول ها نیز می توان برای دستکاری جنین استفاده کرد. در سال 2001، پژوهشگران از طریق انتقال مؤثر سلول‌های زایا (80 درصد) با استفاده از حامل‌های دارای نسخه برداری ناقص رتروویروسی به درون تخم در مرحله بلاستودرم، بلدرچین تراریخت تولید کردند (Mizuarai et al., 2001). برای افزایش بازده بیان ژن و انتقال سلولهای زایا، پژوهشگران تحقیقات را روی مرحله رشد مناسب رویان برای تزریق حامل-

5 Blastodermal cell
6 Embryonic stem cells
7 Primordial germ cells
8 Spermatogonial stem cell

Archive of SID

www.SID.ir

های ویروسی انجام دادند. در جوجه‌ها چندین طبقه از حامل‌های رتروویروسی وجود دارد که در مرحله X به رویان انتقال داده می‌شوند. محققان توانستند حداکثر سطح بیان را با تزریق حامل‌های رتروویروسی دارای نسخه بردای ناقص درون قلب جنین پس از 55 ساعت انکوباسیون، به دست آورند (Masamichi et al., 2005). همچنین در سال 2009، این پژوهشگران گزارش موفقی مبنی بر تولید آنتی‌بادی منوکلونال در زرده و سفیده تخم با استفاده از روش تزریق حامل‌های رتروویروسی دارای نسخه برداری ناقص درون قلب جنین پس از 55 ساعت انکوباسیون را ارائه نموده اند (Kamihiraa et al., 2009). امروزه مشخص شده است بیشترین بازدهی هدایت و بیان ژن، زمانی است که ویروس‌های محلول در مرحله مناسب (مرحله 14 - 15) به جنین تزریق شوند (Kawabe et al., 2008). این تحقیقات نشان دادند مهاجرت PGCs از جریان خون به گنادها، می‌تواند هدف مناسبی برای تولید جوجه‌های تراریخت توسط حامل‌های رتروویروسی باشد. بنابراین، با استناد به گزارشات قبلی می‌توان گفت رشد مناسب جنین همراه با روش انتقال ژن به وسیله لنتی‌ویروس‌ها یا رتروویروس‌های دارای نسخه برداری ناقص می‌تواند تا حد زیادی باعث بهبود انتقال ژن به پرندگان شود. اگرچه با استفاده از دستکاری مستقیم جنین به وسیله DNA یا حامل‌های ویروسی می‌توان جوجه‌های تراریخت تولید کرد، اما این روش توانایی دستکاری جایگاه اختصاصی (هدف قرار دادن ژن مشخص) در ژنوم را ندارد. زیرا ژن‌های منتقل شده به صورت تصادفی در کروموزوم‌های میزبان ادغام می‌شوند (Van de Lavoir et al., 2006). یکی دیگر از معایب این روش اثرات ناشی از جایگاه قرار گرفتن ژن انتقال داده شده در کروموزوم می‌باشد که احتمالاً سبب بیان متغیر تراریخت در بدن میزبان می‌شود. به همین دلیل، استفاده از ژن هدف برای تولید پرندگان تراریخت مورد توجه قرار گرفته است. زیرا در این روش احتمال بدست آوردن فنوتیپ قابل پیش‌بینی که از نظر اقتصادی دارای اهمیت می‌باشد نسبت به وجود لاین‌های مختلف از پرندگان که از طریق ادغام تصادفی ژن بدست آمده‌اند، بیشتر است (Dodgson, 2007).

روش‌های غیرمستقیم

در روش انتقال ژن بر پایه سلولی، ژن هدف درون ژنوم قرار می‌گیرد و می‌توان بیان ژن انتقال یافته را قبل از انتقال سلول‌ها به رویان مورد آزمایش قرار داد. این روش اجازه می‌دهد که تراریخت‌هایی با اهداف مختلف تولید شود. اولین قدم در تولید تراریخت ها بر پایه سلول، به دست آوردن محیط کشت سلولی مناسب است. از ویژگی‌های این محیط کشت می توان به مناسب بودن شرایط برای ورود لاین سلول‌های زایا، آلوده شدن از طریق ساختمان DNA و انتقال سلول های

Archive of SID

www.SID.ir

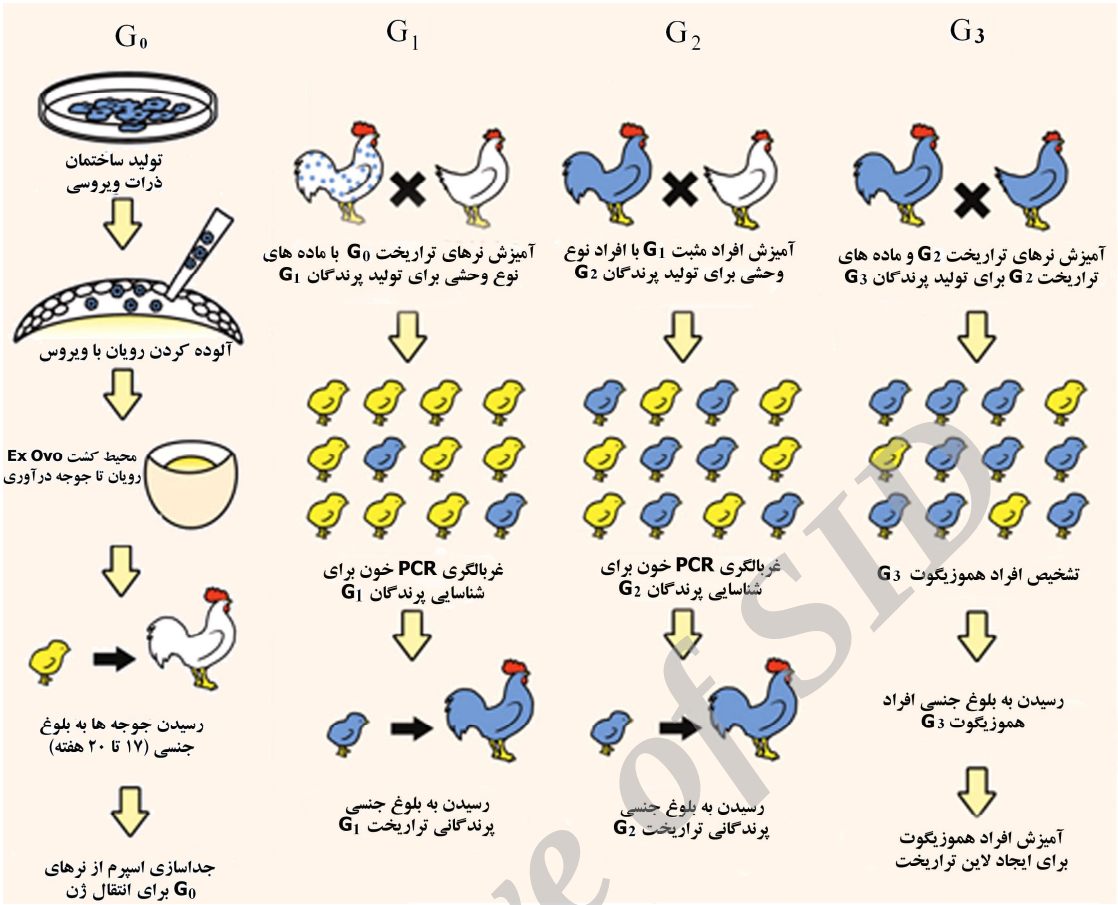
آلوده به داخل رویان اشاره کرد. سپس فرزندان نسل G_0 با جوجه‌های نسل G_1 که تراریخت را حمل می‌کنند آمیزش داده می‌شوند (شکل 1). برنامه این تکنیک تلاش می کند تا سه فناوری مهم: الف) توانایی سلول های کشت شده که بتوانند به داخل سلول های زایا وارد شوند، ب) رشد ساختمان مناسب DNA و ج) توانایی تولید سلول‌های پیش-ساز گامت شیمر را با هم هماهنگ کند. در سال 1990 اولین جوجه‌های تراریخت با سلول های زایایی شیمر تولید شدند و به دنبال آن، تولید طیور با سلولهای زایای شیمر به روشی متداول و عمومی تبدیل شد (Bednarczyk et al., 2000; Speksnijder & Ivarie, 2000; Li et al., 2008).

استفاده از سلول‌های بلاستودرم در تولید پرندگان تراریخت

در جوجه‌ها، لقاح یک ساعت بعد از تخمک اندازی صورت می‌گیرد و رشد رویان سه ساعت بعد از آغاز آمیخته شدن پیش هسته‌های نر و ماده شروع می‌شود (Perry, 1988). اولین تقسیم دو ساعت به طول می‌انجامد و تخمک وارد غده پوسته می‌شود. پوسته در طول 20-18 ساعت تشکیل می‌شود و تخم در این شرایط حاوی 40000 تا 80000 سلول با مورفولوژی تمایز نیافته است. این مراحل توسط ایبال-گیلادی و کوواچ در سال 1976 به نام سلول‌های مرحله X نامگذاری شدند (Eyal-Giladi & Kochav, 1976). پژوهشگران بسیاری با استفاده از سلول‌های بلاستودرم در مرحله X، سلولهای زایای شیمر تولید کرده‌اند (Carsience et al., 1993; Maeda et al., 1997; McGrew et al., 2004). آن‌ها پیشنهاد کردند که مرحله X رویانی بهترین مرحله برای تولید جوجه‌های شیمر می‌باشد زیرا رویان در این مرحله دارای تعداد زیادی سلول با مورفولوژی تمایز نیافته است. همچنین این تحقیقات نشان دادند که سلول‌های بلاستودرم علاوه بر حفره جنسی، در درون زرده نیز به مقدار زیادی وجود دارند (Maeda et al.,1997). سلول‌های بلاستودرم به عنوان محرک‌های ایجاد سلول‌های سوماتیک و سلولهای زایای شیمر مورد استفاده قرار می‌گیرند. با تابش پرتوی گاما و یا حذف قسمت مرکزی سلول‌های بلاستودرم راندمان تولید شیمر بالا می-رود (Carsience et al., 1993; Kagami et al., 1997). تحقیقات نشان می‌دهند سلول‌های بلاستودرم برای انتقال ژن با استفاده از روش‌های مختلف، مثل لیپوزوم‌ها و رتروویروس‌ها نیز مناسب می‌باشند (Kamihiraa et al., 2005, Wang et al., 2006). گزارش شده است تزریق به مرکز گیرنده سلول‌های بلاستودرم باعث ایجاد رویان‌هایی با سرهای غیرنرمال می‌شود (Maeda et al., 1997). مهمترین مشکل این روش نرخ پایین تولید شیمر می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1- گام های اصلی و اساسی در تولید و ایجاد لاین تراریخت. در این نمونه از حامل ویروسی استفاده شده است. با این حال، روش های دیگر مشابه این مراحل می باشند. برای ساخت نسل G_0، ساختمان ویروس باید تولید شود و رویان‌ها به وسیله آنها آلوده شوند. رویان ها در محیط کشت Ex Ovo کشت داده می شوند، جوجه‌ها متولد می‌شوند و بعد از آن تا زمان بلوغ جنسی برای جداسازی موزائیک ها پرورش داده می‌شوند. ساخت نسل 1 تا 3 نیاز به زمان، هزینه و امکانات زیادی برای ایجاد و مشخص کردن لاین تراریخت دارد (Mozdziak & Petitte, 2004).

Figure 1 - General steps in the production and establishment of a transgenic chicken's line. The viral vectors were used as an example illustrates. However, the process is similar to other methods. Generation 0 (G0) involves the construction and production of virus and the infection of embryos followed by Ex Ovo culture, hatching, rearing, and screening of putative mosaics for breeding. Generations 1–3 (G1–3) require the majority of time, cost, and facilities to establish and characterize a usable line of birds (Mozdziak & Petitte, 2004).

Archive of SID

www.SID.ir

در آزمایشی از 184 تخمی که رویان به آن انتقال داده شده بود، 41 جوجه متولد شدند که فقط شش جوجه شیمر بودند (Ono et al., 1994). سلول‌های بلاستودرم پرندگانی که در محیط آزمایشگاهی کشت داده شده‌اند نمی‌توانند بیش از یک هفته در سلولهای زایای‌های شیمر حضور داشته باشند. از آنجایی که سلول‌های بلاستودرم قابلیت تمایز دارند، تعدادی از محققان تلاش کردند تا از این سلول‌ها به عنوان پیش‌ساز سلول‌های ESCs استفاده کنند (Pain et al., 1996).

ویژگی‌های سلول‌های زایای بدوی برای تولید پرندگان تراریخت

سلول‌های زایای بدوی (PGCs) سلول‌های پیشرو تولید گامت هستند و در پرندگان می‌توان آن‌ها را به وسیله جدا کردن ناحیه هلال جنسی، که محل انباشتگی این سلول‌هاست و یا گرفتن نمونه خون در زمان مهاجرت این سلول‌ها بدست آورد (Vick et al., 1993). مهاجرت PGCs در پرندگان با پستانداران تفاوت دارد (جدول 1). در پرندگان ابتدا PGCs در اپی‌بلاست[9] تولید می‌شود و در مرحله X در مرکز پلوسیدا[10] قرار می‌گیرد (Eyal-Giladi & Kochav, 1976). پس از 18 تا 19 ساعت انکوباسیون به هیپوبلاست[11] ناحیه پلوسیدا (هلال جنینی) منتقل می‌شود. بین مرحله 10 و 12، PGCsها از هلال جنینی به سمت جریان خون حرکت می کنند. آن‌ها تا زمانی که به برآمدگی جنسی نرفته‌اند، در سیستم جریان خون باقی می‌مانند (Motono et al., 2010). این سلول‌ها از طریق گردش خون جنین به قسمت تاج گناد مهاجرت می‌کنند و به گنادهای بالغ تبدیل می‌شوند (Nakamura et al., 2007). قابلیت منحصر به فرد PGCs، که سبب انتقال از طریق جریان خون و تسهیل تولید سلولهای زایای شیمری از طریق تزریق آلوژنیک و یا اگزوژنیک می‌شود به تولید سلول‌های پرتوان می انجامد. سلولهای زایای شیمر با جمع آوری PGCs از خون رویان در طول مرحله 13-17 تولید می‌شوند و سپس به رویان‌های گیرنده تزریق می‌شوند. میزان انتقال سلول‌های زایای شیمر در این روش نسبت به سلول‌های بلاستودرم بیشتر می‌باشد (11/3 تا 96 درصد). پژوهشگران در سال 2004 گزارش کردند که بیشتر تلاش ها برای کشت سلول های بنیادی رویانی پرندگان، بر روی مرحله X بلاستودرم یا PGC می‌باشد (شکل 2).

9 Epiblast
10 Pellucida
11 hypoblast

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1- الگوی مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در پرندگان و پستانداران.

Table 1 - Pattern of primordial germ cells migration in poultry and mammalians.

مراحل EG & K[a], H & H[b]	پرندگان (جوجه)
Stages H & H[b], EG & K[a]	***Birds (chicken)***
مرحله x	ناحیه مرکزی پلوسیدا
Stage X	***Central region of area pellucida***
مرحله 4	هلال ژرمینال (جنسی)
Stage IV	***Germinal crescent***
مرحله 10-17	حرکت و گردش در رگ‌های خونی خارج رویانی
Stage X-IIVX	***Move and circulate in extra-embryonic blood vessel***
مرحله 20-26	مهاجرت و قرار گرفتن در گنادهای رویان
Stage XX-XXVI	***Migration and colonization into embryonic gonad***
جوجه درآوری	تفکیک و تمایز به اندام‌های جنسی
Haehabilty	***Separation and differentiation to sex organ***
روز جنینی	**پستانداران (موش)**
Embryonic Day	***Mammalian (Mice)***
E6-6.5	از اپی‌بلاست تولید می شود
	First arise from epiblast
E7-7.5	ابتدا در بخش پسین کانال هاضمه جنینی، دیده می‌شود.
	First seen at region of forming hindgut
E9.5	ناحیه قبل را ترک و به برآمدگی تناسلی مهاجرت می‌کند.
	Leave hindgut and migration to urogenital ridge
E11.5	به برآمدگی genital مهاجرت می‌کند.
	Migration to genital ridge
تولد	تفکیک و تمایز به اندام‌های جنسی
Birth	***Proliferation or differentiation in sex organ***

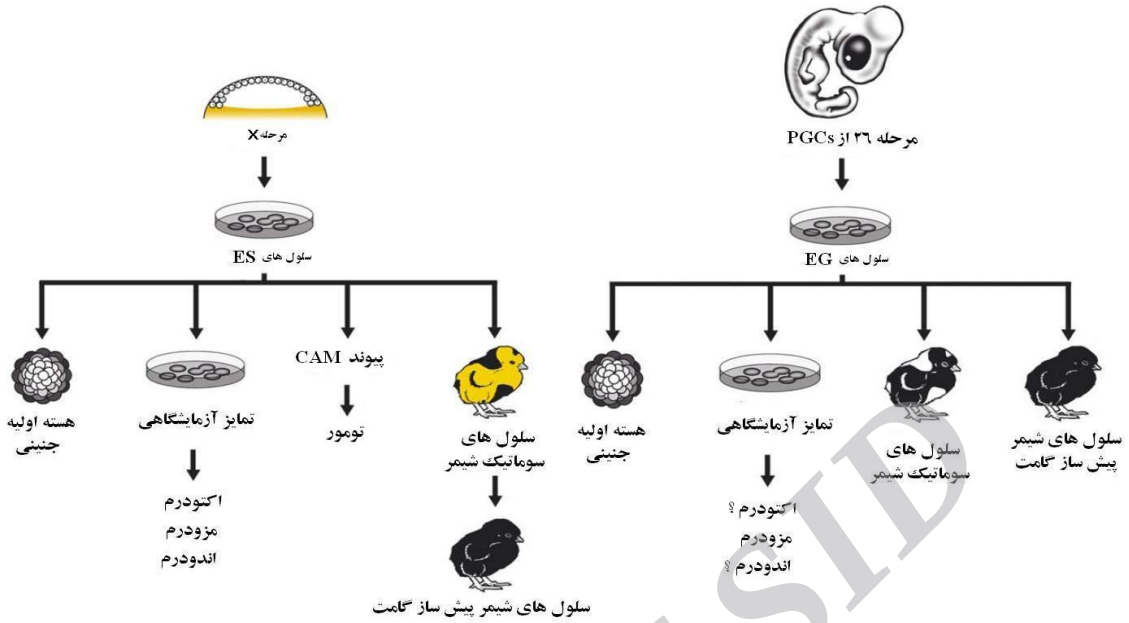
a) Eyal-Giladi & Kochav

b) Hamburger & Hamilton

PGCs در هر دو گونه از اپی‌بلاست نشأت می‌گیرد اما دارای مسیرهای مهاجرتی متفاوتی در دو گونه می‌باشد (Cherentaeva et al., 2008, Petitte et al., 2004).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل2- منشا سلول های پرتوان بنیادی رویان در جوجه ها. سلول های بنیادی رویان در مرحله X رویانی از طریق هسته اولیه جنین، تمایز آزمایشگاهی و از طریق تومور وقتی که به CAM[12] پیوند زنده شده باشند، قابل تشخیص هستند. هنگامی که ESCs به رویان گیرنده مرحله X تزریق می شوند آنها می توانند سبب افزایش لاین شیمری سلول های بنیادی و زایا شوند. سلول های زایای بدوی از مرحله 27 رویان می توانند به عنوان سلول های زایایی رویانی کشت داده شوند. این سلول ها می توانند از هسته اولیه جنین، تمایز آزمایشگاهی و شیمر بنیادی و سلول های شیمر پش ساز گامت نسبت به مرحله جنین گیرنده برای کشت جدا شوند (Petitte et al., 2004).

Figure 2 - The origin of embryonic pluripotent stem cells in the chick. Embryonic stem cells established from stage X embryos can form embryoid core bodies, differentiate in vitro, and form tumor when grafted on the CAM. When ESCs are injected into recipient stage X embryos, they can give increase to somatic/germ line chimeras. Primordial germ cells from the stage 27 embryo can be cultured as embryonic germ cells. Primordial germ cells can derived for culturing form earliest embryoid core bodies, differentiate in vitro, and form somatic chimeras or germ line chimeras depending upon the stage of the recipient embryo (Petitte et al., 2004).

12 chorioallantoic membrane

Archive of SID

www.SID.ir

دانشمندان نشان داده‌اند PGCs جدا شده می‌تواند به دیگر گیرنده‌های رویان، در مرحله‌ای که PGCs در خون در حال گردش است انتقال یابند (Mozdziak et al., 2006). بنابراین راه دیگر برای تولید شیمرها، انتقال ژن به PGCs و سپس اتصال آن به جنین‌های گیرنده است. از آنجاکه PGCs منشاء اسپرم و تخمک می‌باشند انتظار می‌رود بازدهی انتقال به سلولهای زایای بالاتر باشد. همچنین کشت آزمایشگاهی PGCs سبب افزایش راندمان انتقال سلولهای زایای می‌شود. Van de Lavoir et al., (2006) سیستم قدرتمندی را ارائه کردند که از طریق آن PGCsها می‌توانند برای مدت طولانی در محیط کشت باقی بمانند، در حالی که توانایی تبدیل شدن به سلولهای زایا را همچنان حفظ کنند. با این حال مقدار PGCs که از خون جنین بدست می‌آید (به میزان کمتر از 0/05 درصد از کل سلول‌های خون) مهمترین و اصلی-ترین محدودیت تکنیکی استفاده از PGCs برای انتقال ژن می‌باشد (Park et al., 2003). برای از بین بردن این محدودیت محققان پیشنهاد کردند که PGCs را از گنادهای جنین جدا کنند. در سال 1994 پژوهشگران توانستند برای اولین بار PGCs را از گناد 5 روزه جدا کنند (Allioli et al., 1994). گروهی از پژوهشگران به طور مستقیم بازدهی PGCs را در جنین‌های 2/5 و 5 روزه از نظر مهاجرت به گنادهای دریافت کننده، مقایسه کردند و موفق شدند با استفاده از gPGCs آلوده شده با حامل لنتی ویروسی، نسل تراریخت ایجاد کنند (Motono et al., 2010). برای افزایش راندمان انتقال سلولهای زایا و تغییرات ژنتیکی، محققان سه روش استفاده از امولسیون بوسولفان[13] برای غیرفعال کردن PGCs اندوژنوس، حذف با جراحی قسمت مرکزی ناحیه پلوسیدا و استفاده از تابش اشعه ایکس و یا گاما به تخم پذیرنده را پیشنهاد کرده‌اند (Furuta & Fujihara, 1999; Kagami et al., 1997; Lim et al., 2006)

توانایی‌های سلول‌های بنیادی اسپرم

در پژوهش‌های گذشته، به مقدار زیادی از سلول‌های بلاستودرم، سلول‌های بنیادی جنین و سلول‌های زایای بدوی برای تولید پرندگان شیمر استفاده می‌شد و القاگرهای انتقال سلولهای زایا، از رویان توسعه یافته جوجه بازیافت می شدند. این روش‌ها بسیار دشوار و زمان بر بودند، زیرا همه آن‌ها به تولید تعداد زیادی حیوان تراریخت نیاز دارند و این حیوانات باید تا زمان بلوغ جنسی برای آزمون‌های مولکولی و تلاقی آزمون (تست کراس) نتاج بدست آمده از جنین‌های دستکاری شده، نگهداری شوند (Li et al., 2008). همچنین بازیافت مجدد PGCs از رویان هنوز ناکارآمد می-باشد و دستورالعمل این روش از نظر تکنیکی دارای مشکل می‌باشد. از این رو در سالهای اخیر پژوهشگران روش SSCs را برای تولید پرندگان

13 Busulfan

Archive of SID

www.SID.ir

تراریخت مورد توجه قرار داده‌اند. سیستم کشت بیضه‌ای از سلول‌های سوماتیک اسپرماتوگونیال در موش برای اولین بار در سال 1994 پیشنهاد شد (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994). پس از آن مطالعات روی موش نشان داد که سلول‌های بیضه دارای بخشی کوچکی از SSCs هستند که می‌توانند منشاء اسپرتوماژنوسیز باشند (Hamra et al., 2005; Kanatsu-Shinohara et al., 2003). به دنبال آن پژوهشگران توانستند SSCs را در سلول‌های بیضه پرندگان شناسایی کنند (Jung et al., 2007). به طور کلی PGCs داخل گنادهای رویانی می‌باشد و در حیوانات نر، درون اسپرماتوگونیال بیضه انتقال می‌یابد. سیستم کشت بیضه از مراحل بیولوژیکی تولید اسپرم بهره برده و از SSCs به عنوان القاگر در جوجه‌های تراریخت استفاده می‌کند. میزان تولید اسپرم به SSCs بستگی دارد که سهم کوچکی از سلول‌های بیضه را شامل می‌شوند اما دارای نقش بسیار مهمی می‌باشند. تعداد سلول‌های SSCs در بیضه‌های جوجه‌ها به شدت با افزایش سن تغییر می‌کنند. این روش می‌تواند در بیضه وضعیت شیمر موضعی ایجاد و حیوانات تراریخت هموزیگوت در نسل G_1 تولید کند. پژوهشگران اعتقاد دارند انتقال مناسب ژن به درون مخلوطی از سلول‌های بیضه اولیه که ممکن است هدفش SSCs باشد، مسیر تولید پرندگان تراریخت را هموارتر می‌کند (Lee et al., 2006). در این روش لاین سلول‌های پرتوان تنها با استفاده از تشخیص آزمایشگاهی از بیضه‌های بالغ بدست می‌آید و سپس به طور مستقیم به بیضه‌های بالغ تزریق می‌شود. بنابراین، نیاز به بازیابی سلول‌های PGCs نیست و زمان برای آزمون‌های مولکولی و تلاقی آزمون کاهش پیدا می‌کند. همچنین سیستم کشت بیضه ای در مقایسه با کشت رویانی، به مدت زمان کمتری نیاز دارد و می‌توان شیمری مشابه سیستم کشت رویانی تولید کرد. در برخی از تحقیقات سیستم رتروویروسی برای دستکاری ژنتیکی SSCs مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً حامل‌های لنتو-ویروسی نیز برای تولید موش‌ها و خرگوش های تراریخت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Park, 2007). در سال های اخیر روشی با بازدهی بالا برای جداسازی، خالص‌سازی و کشت SSCs در شرایط آزمایشگاهی توسط پژوهشگران طراحی شده است (Park, 2007). همچنین پژوهشگران نشان دادند که سلول‌های بیضه جوجه می‌تواند به طور مؤثری در آزمایشگاه با یک حامل رتروویروسی گزارشگر دارای نسخه برداری ناقص، که توسط گلیکوپروتئین (VSV-G)[14] سطح آن پوشیده شده است، آلوده شوند (Borwompinyo et al., 2005). محققان با استفاده از اطلاعات بدست آمده، SSCs آلوده شده را به شکل مستقیم به بیضه خروس منتقل کردند و جوجه‌های تراریخت با بازدهی بالایی تولید کردند (Li et al.,

14 Vesicular stomatitis virus envelope glycol-protein

Archive of SID

www.SID.ir

2008). پژوهشگران دیگری نیز SSCs را از بافت بیضه جنین جدا کردند و آن‌ها را برای بیشتر از 2 ماه بعد از خالص‌سازی در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند. علاوه بر این، آن‌ها دریافتند که SSCs منتقل شده می‌توانند در غشای بازال قرار گرفته، تکثیر شوند و به اسپرم تمایز یابند (Yu et al., 2010). این روش ساده و مؤثر، مسیر جدیدی برای تولید جوجه‌های تراریخت در مقیاس بالا فراهم کرده است. تمامی این مطالعات نشان می‌دهند که روش عملی برای تولید پرندگان تراریخت استفاده از SSCs می‌باشد.

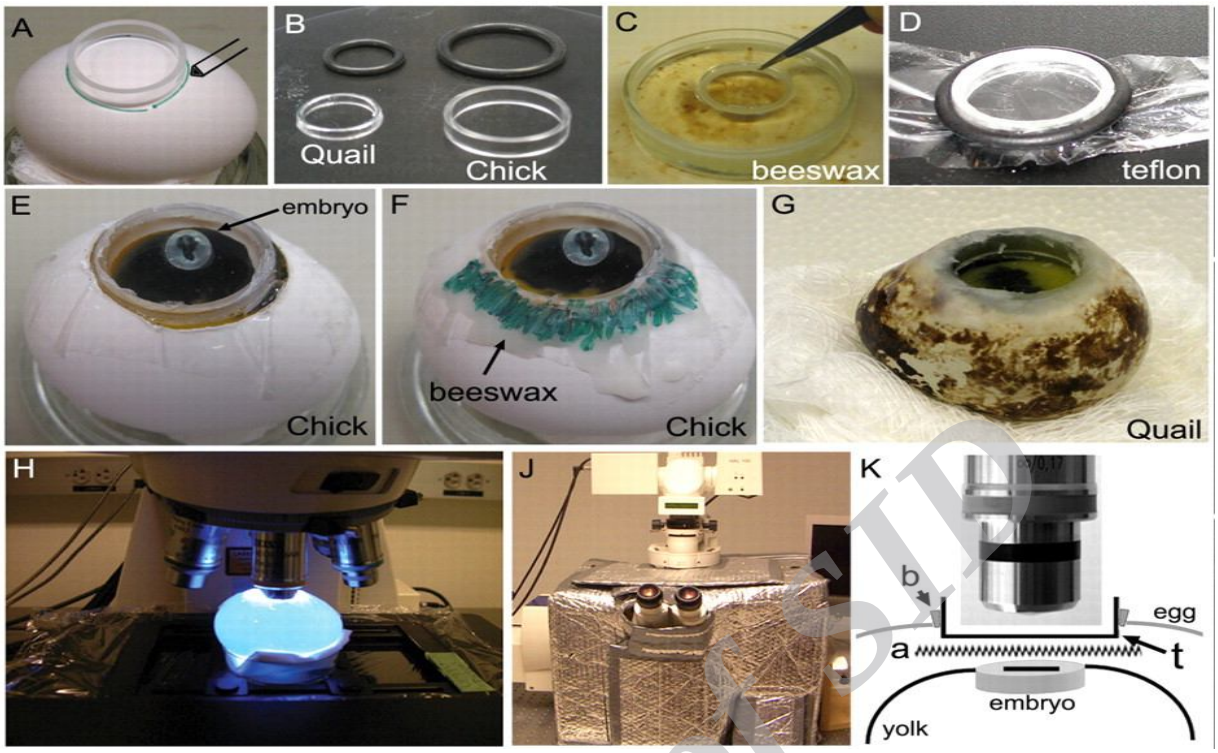
دستکاری رویان

یکی از بزرگترین مشکلاتی که برای تولید جوجه‌های تراریخت با استفاده از روش‌های مختلف وجود دارد، دستکاری رویان برای وارد کردن ژن خارجی درون سلول‌های جرملاین می‌باشد. در گذشته پنجره‌ای کوچک در پوسته تخم ایجاد و بعد از دستکاری رویان، پوسته با یک ماده چسبنده مهر و موم می‌شد در نتیجه قابلیت جوجه‌درآوری با استفاده از این روش قدیمی و ساده بسیار پایین بوده است (شکل 3) (McGrew et al., 2004; Petitte et al., 1990). قابلیت جوجه‌درآوری مناسب تخم‌های پنجره‌دار برای تولید پرندگان تراریخت کارآمد، بسیار مهم است. قابلیت جوجه¬درآوری تخم دستکاری شده با خرد نکردن پوسته و پوشاندن پنجره با استفاده از PBS[15] بهبود پیدا کرد. بعد از آن محققان غشای پوسته را در حالیکه تحت تاثیر PBS بود، برش دادند و سلول‌ها را درون رویان تزریق و تخم را توسط غشا پوسته و چسب Duce مهر و موم کردند (Speksnijder & Ivarie, 2000). قابلیت جوجه‌درآوری روش پنجره‌ای با استفاده از این عمل از 6 درصد به 30 درصد افزایش یافت. با تزریق رتروویروس‌ها در روش پنجره‌ای قابلیت جوجه‌درآوری 23 تا 35 درصد بهبود یافت (Harvey et al., 2002a). همچنین قابلیت جوجه‌درآوری با انکوبه کردن تخم‌ها برای 7-5 روز قبل از تزریق سلول‌ها به قسمت انتهایی تخم، افزایش یافت (Bednarczyk et al., 2000). یکی دیگر از موارد مورد توجه در روش پنجره‌ای، استفاده از سیستم کشت Ex Ovo مایع تازه تخم می‌باشد (Perry, 1988). به طور خلاصه، در این روش محتوای مایع تازه تخم در پوسته تخم جوجه‌ها قرار داده می‌شود و رویان‌ها توسط حامل مناسب تزریق می‌شوند. قسمت جدا شده پوست تخم جوجه‌ها با Saran-Warap به مدت سه روز پوشیده می‌شود. به دنبال آن رویان جوجه‌ها داخل قسمت جدا شده از پوسته تخم که با Handi-warp قبل از جوجه‌درآوری پوشیده شده، منتقل می‌شود.

15 Phosphate Buffered Saline

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 3- روش کشت رویان با استفاده از ایجاد پنجره در پوسته تخم. شکل‌های **A** تا **G** مراحل نشانه گذاری محل پنجره بر روی تخم و ساخت یک غشای تفلون که با استفاده از آن می توان در داخل رویان را مشاهده نمود نشان می‌دهد. **(A)** حلقه پلاستیکی بر روی محل قرارگیری رویان قرار داده شده و این وضعیت نشانه گذاری می‌شود. **(B)** اندازه حلقه با اندازه تخم و یا رویان در ارتباط است. حلقه‌های پلاستیکی و حلقه‌های لاستیکی برای بلدرچین و جوجه‌ها مناسب هستند. **(C)** حلقه‌ها در داخل موم ذوب شده غوطه ور می شوند. **(D)** سپس حلقه ها بر روی غشای تفلون قرار داده می شود. حلقه لاستیکی بر روی حلقه پلاستیکی قرار گرفته و سبب محافظت بیشتر محیط داخل تخم می‌شود. **(E)** بعد از شکل دادن و برش مناسب غشای تفلونی، حلقه بر روی قسمت بالای رویان قرار می‌گیرد. **(F)** موم ذوب شده در اطراف حلقه پلاستیکی ریخته می‌شود. **(G)** مرحله **(F)** را در تخم بلدرچین نشان می دهد. **(H)** تخم در زیر میکروسکوپ قرار داده می‌شود (با رنگ آبی روشن شود). **(J)** میکروسکوپ با اتاقک گرمایی پوشیده می‌شود. **(K)** مسیر مشاهده در میان پنجره تفلونی که شامل غشایی تفلون می‌باشد. **(t)** مایع بالایی آلبومین و محلول رینگر، **(a)** قسمت بالایی رویان بر روی سطح زرده می باشد و **(b)** موم می‌باشد **(Kulesa et al., 2010).**

Figure 3 - Embryo culture method using a window in the eggshell. (A-G) In Ovo imaging begins with marking the position of the presumptive window in the eggshell and creating a Teflon membrane that will fit into the window to provide an optical pathway to the embryo. (A) An acrylic ring is placed over the embryo and its position is marked. (B) The ring diameter can vary depending on the size of the egg or embryo. Acrylic rings and rubber O-rings appropriate for quail and chick eggs are shown. (C) An acrylic ring is dipped into melted beeswax before (D) being placed onto a Teflon membrane and secured in place with a rubber O-ring around its circumference. (E) After stretching and cutting the Teflon to fit tightly over the acrylic ring, the ring is placed into the hole in the eggshell over the embryo (the embryo contrast has been adjusted to better visualize its position). (F) Warmed beeswax (highlighted in green) is spread around the ring to seal it into the eggshell. (G) The same method applied to a quail egg. (H) The egg is placed on the microscope stage under the objective, which is (J) surrounded by a heated chamber. (K) The optical pathway through the Teflon window includes the Teflon membrane (t), laid above the albumen and Ringer's solution (a) that sits over the embryo on top of the yolk surface; (b) beeswax (Kulesa et al., 2010).

Archive of SID

www.SID.ir

تغییرات ایجاد شده توسط محققین در روش اصلی سبب شد قابلیت جوجه‌درآوری هنگامی که از رتروویروس‌ها استفاده می‌شوند 20 تا 35 درصد افزایش یابد (Perry, 1988; Rowlett & Simkiss, 1987). در تحقیقی خروس‌های G_0 با استفاده از رتروویروس ها تولید شدند که دارای قابلیت جوجه¬درآوری مناسبی بودند. این خروس ها ژن lacZ را در منی خود حمل می‌کردند (Mozdziak et al., 2003). در حال حاضر روش پنجره‌ای و محیط کشت Ex Ovo تنها روش‌هایی هستند که می‌توان با استفاده از آن‌ها DNA بیگانه را درون رویان جوجه‌ها منتقل کرده و فرزندان زیست‌پذیری بوجود آورد.

روش‌های انتقال ژن

روش‌هایی که برای ایجاد پرندگان تراریخت استفاده می‌شوند بیشتر به منظور انتقال ژن‌های خارجی درون سلول‌های هدف می‌باشند. در این روش‌ها بیشتر از رتروویروس‌های مرغی استفاده می‌شود. حامل‌های نسخه برداری ویروس لکوسیز مرغی[16] و حامل‌های نسخه برداری ناقص بدست آمده از ویروس رتیکولوندوتلوسیز[17] برای این روش‌ها بهینه شده‌اند (Bosselman et al., 1989a; Bosselman et al., 1989b; Salter et al., 1986). روش انتقال ژن رتروویروسی برای تولید جوجه‌های تراریخت بسیار متداول می‌باشد (Harvey et al., 2003a; McGrew et al., 2004; Mozdziak et al., 2003). حامل‌های رتروویروسی، ویروس‌هایی دارای ژنوم RNAی کوچکی هستند که درون یک هسته پروتئینی حاوی اینتگراز[18]، آنزیم رونویس معکوس و پروتئاز قرار دارند. پروتئین‌های باند شونده ویروسی گیرنده‌های ویژه بر روی سلول‌های میزبان را گسترش می‌دهند و ذرات ویروسی توسط اندوسیتوز گیرنده‌های میانی به سیتوپلاسم سلولی منتقل می‌شوند. RNA به cDNA کپی شده و به داخل هسته انتقال داده می‌شود و cDNA توسط فعالیت اینتگراز بر روی توالی‌های تکراری انتهایی ویروسی با DNA سلول میزبان ادغام می‌شود. DNA پیش‌ویروسی می‌تواند به RNA ویروسی برای سنتز پروتئین‌ها رونویسی شود که این عمل شامل پلی‌مراز (pol)[19]، آنتی‌ژن-های پیوسته گروهی[20] (gag) و پروتئین‌های توسعه دهنده[21] (env) می‌باشد. این سه رده پروتئینی هسته ویروسی جدیدی را گردآوری کرده و ژنوم RNA ویروسی را بسته‌بندی می‌کنند. این بسته جدید پیچیده به داخل سلول‌های غشاء میزبان منتقل شده و سپس به خارج از سلول انتقال داده می‌شوند. روش استفاده از این ویروس‌ها بدین گونه است که قسمت‌های غیرضروری و بیماری‌زای ژنوم ویروس

16 Leucosis

17 Reticuloendo Thelosis

18 Integrase

19 Polymerase

20 Group-associated antigens

21 Envelope

Archive of SID

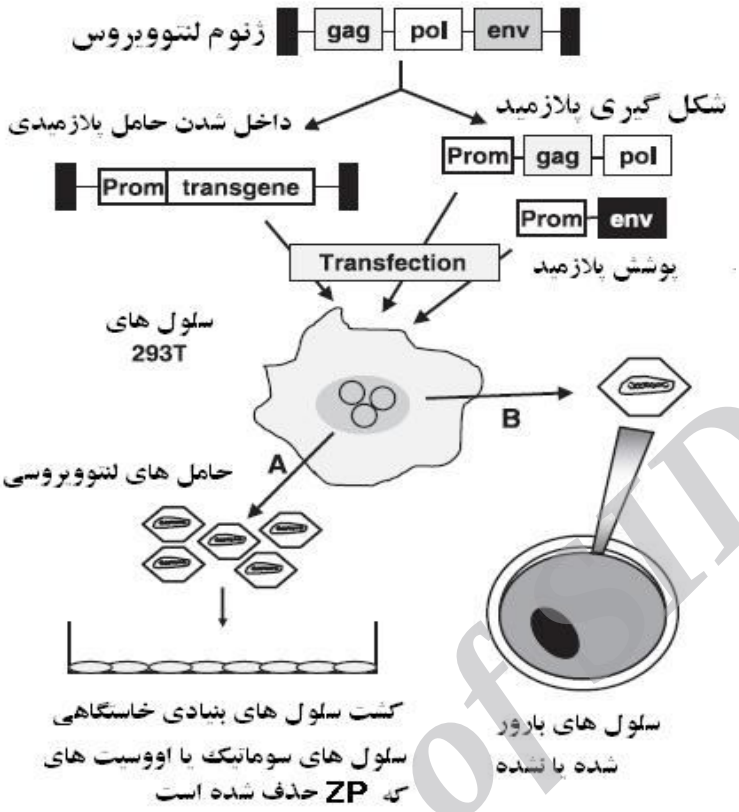
www.SID.ir

با قطعه مورد نظرجایگزین شده و سپس ویروس به سلول میزبان انتقال داده می‌شود و با ژنوم میزبان ادغام می‌گردد. تا به امروز تحقیقات بسیاری روی تولید جوجه یا بلدرچین تراریخت با استفاده از حامل‌های رتروویروسی با موفقیت همراه بوده است (Harvey et al., 2002a; Harvey et al., 2002b). وجود محدودیت‌هایی از قبیل طول قطعه معرفی شده (کمتر از 8 kb)، ادغام ژن انتقال یافته (تنها درون سلول‌های تقسیم شده)، تشخیص سلول‌های هدف خاص و حساسیت بالا به خاموش شدن ژن سبب افزایش استفاده از حامل‌های لنتوویروسی شده است. حامل‌های لنتوویروسی که از ویروس کم خونی عفونی اسب مشتق شده‌اند، می‌توانند به منظور انتقال ژن به سلولهای زایا در مرغ‌ها مورد استفاده قرار گیرند (McGrew, 2004). محققین در سال 2002 برای اولین بار از لنتوویروس‌ها برای تولید تراریخت‌ها استفاده کردند (Lois et al., 2002, Pfeifer et al., 2002). مطالعات بر روی موش و موش صحرایی نشان دادند که تزریق حامل‌های لنتوویروسی VSV-Gpseudotyped داخل فضای پرده ویتلین اووسیت بارورشده، موشهای تراریخت با راندمان بسیار بالا (73-68 درصد) تولید می‌کند (Lois et al., 2002). حامل-های لنتی ویروسی برای ادغام شدن نیاز به تقسیم سلولی ندارند، زیرا انتقال اطلاعات ژنتیکی آن‌ها درون سلول میزبان مستقل از تقسیم سلولی بوده و همچنین آن‌ها طیف گسترده‌ای از سلول‌های میزبان را مورد هدف قرار می دهند (Cockrell & Kafri, 2007). این حامل‌ها با راندمان بالایی با ژنوم میزبان ادغام می‌شوند به خصوص در سلول‌هایی که فعالیت ندارند. ساختار ژنتیکی و کاربرده‌های پیچیده حامل های لنتوویروسی در شکل 4 توضیح داده شده است.

این روش ابزار نیرومندی برای بیان ژن‌های مطلوب انتقال یافته در بافت اختصاصی یا حذف مستقیم ژن‌های نامطلوب در پرندگان می‌باشد. بعد از استفاده اولیه از لنتوویروس‌ها، کلاس‌های مختلفی از حامل‌های لنتوویروسی برای تولید پرندگان تراریخت مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد، فراوانی تولید تراریخت‌ها با استفاده از این روش 10 تا 100 برابر بیشتر از تراریخت‌های به دست آمده با استفاده از روش‌های قبلی می‌باشد (Chapman et al., 2005; Motono et al., 2010). علاوه بر این، تا به امروز خاموش شدن ژن یا از دست دادن بیان تراریخت در طول زمان و یا نسل‌ها به ندرت گزارش شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 4- تولید حامل های لنتی ویروسی. لنتی ویروس های نوع وحشی از سه ژن اصلی تشکیل شده اند **(gag, pol & env)** و توسط توالی‌های انتهایی تکرارشونده احاطه شده اند **(رنگ مشکی)**. سیستم ویروس ها چند ژنی است که به موجب آن ساختمان و بسته بندی ژن ها به صورت بخش های جداگانه به داخل ژنوم میزبان ادغام می شود. ژن **env** می تواند با گلیکوپروتئین هترولوگوس که از ویروس های مختلف بدست آمده جایگزین شود که بیشتر از **VSV-G** استفاده می شود. سه پلازمید **(یا بیشتر)** به داخل لاین سلولی برای تولید حامل های ویروسی انتقال داده می شود **(سلول های 293T)**. برای تولید حامل های ویروسی مایع فاز بالایی جمع آوری می شود و برای تولید تراریخت‌ها به وسیله آلوده سازی**(A)** یا تزریق مستقیم **(B)** با پروموتور ویروسی و یا سلولی در سلول های بارورشده یا نشده مورد استفاده قرار می گیرد **(Park, 2007)**.

Figure 4 - Lentiviral vector production. The wild-type lentiviral genome is made up of 3 main genes (gag, pol & env) and it is surrounded by long-terminal repeats (black color). The vector system is a split-genome format whereby the packaging and structural genes have been separated and that promotes integration into the host genome. The env gene can be replaced with a heterologous glycoprotein from various viruses, including the prominently used VSV-G. The 3 plasmids (or more) are transfected into a cell line (293T cells) to produce the viral vectors, which are collected in the supernatant for in vitro transgenic applications either by infection (A) or by direct injection (B) can be used with viral or cellular promoter in fertilized or unfertilized cells (Park, 2007).
Prom: viral or cellular promoter, ZP: zona pellucida

Archive of SID

www.SID.ir

در کنار پیشرفت‌های فوق العاده استفاده از روش‌های ویروسی، معایب و مشکلات خاصی از قبیل مسائل ایمنی، احتمال ادغام رتروویروس‌ها در نزدیکی ژنهای سرطان‌زای[22] بالقوه و به دنبال آن فعال شدن این ژن‌های سرطان‌زا و تبدیل شدن این سلول‌های با فعالیت طبیعی به سلول‌های سرطانی و غیره را به دنبال دارد (Cockrell & Kafri, 2007). لنتوویروس‌ها توانایی انتقال قطعات DNAی درحدود 8/5 تا 10 جفت کیلو باز را دارند. بنابراین برای استفاده از این حامل‌ها محققین مجبورند پرومتور را کوتاهتر در نظر گیرند و یا قسمت‌های از ژن را کوتاه کنند که این سبب تاثیر منفی در تظاهر ژن می شود (Mohammadabadi, 2008). مشکلات موجود در روش‌های ویروسی باعث شد پژوهشگران از راه‌های دیگری همچون ریزتزریقی، انتقال لیپوزوم، الکتروپوریشن و جداسازی کلسیم فسفات اسید استفاده کنند. ریزتزریقی تخم با انجام سه مرحله از سیستم کشت Ex Ovo باعث جوجه درآوری می‌شود (Love et al., 1994; Sherman et al., 1998). در سال 1994، ریزتزریقی DNA به درون پیش هسته تخم‌های جوجه تازه بارور شده گزارش شد، اما به دلیل بازدهی پایین انتقال و مراحل تولید پر زحمت، در تولید پرندگان تراریخت به میزان کمتری استفاده می‌شود (Love et al., 1994).

مطالعات نشان می‌دهد که بازدهی انتقال و میزان بقا سلولی با استفاده از روش الکتروپوریشن در مقابل روش‌های لیپوزوم یا کلسیم فسفات اسید بالاتر است (به ترتیب 20/59 در مقابل 9/75 و 5/61 و 69/86 در مقابل 65 و 51/16 درصد) (Yu et al., 2010). محققان توانستند با تزریق 177 رویان گیرنده که سلول‌های بلاستودرم آن‌ها با الکتروپویشن آمیخته شده بود، شش جوجه زنده تولید کنند (Aritomi & Fujihara, 2000). اما، در مطالعات اخیر روش انتقال لیپوزوم به طور گسترده‌ای برای انتقال مؤثر ژن‌های خارجی درون سلول‌ها و جنین‌ها استفاده می‌شود (Suraeva et al., 2008; Wang et al., 2006). افزایش میزان لیپید در مخلوط لیپوزوم سبب افزایش به دام افتادن DNA در داخل لیپوزوم می‌شود، اما باعث کاهش انتقال DNA به اسپرم نیز می‌شود (Ono et al., 1994).

کاربردها

تکنیک‌های تراریخت کاربردهای گسترده‌ای در پرندگان دارند لذا می‌توان به تولید پروتئین‌های فعال زیستی با ارزش و تسریع در برنامه‌های پرورشی مرسوم به منظور افزایش و بهبود صفات تولیدی مطلوب اشاره کرد. باتوجه به موارد ذکر شده، مهمترین هدفی که در تحقیقات به آن توجه شده، بدست آوردن جوجه یا بلدرچین به عنوان راکتورهای زیستی، با هدف تولید پروتئین‌های

22 oncogene

Archive of SID

www.SID.ir

نوترکیب مفید و بازارپسند می‌باشد. زیرا سیستم راکتورهای زیستی پرندگان تراریخت در مقایسه با گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و پستانداران دارای چندین مزیت بدین شرح می‌باشد: 1- تولید پروتئین در تخم پرندگان بیشتر است و همچنین بالغ بر 50 درصد این پروتئین‌ها، از بیان ژن‌های منفرد حاصل می‌شوند، بنابراین بدست آوردن مقدار زیادی پروتئین نوترکیب همراه با خلوص بالا آسان می‌باشد (Robert, 2006). 2- الگوی گلیکوزیله شدن برخی از پروتئین‌های انسانی شباهت بیشتری به پروتئین‌های پرندگان در مقایسه با سایر سیستم-های راکتورهای زیستی دارد (Raju et al., 2000). باید توجه داشت که اگر پروتئینی به شکل اختصاصی گلیکوزیله نشود سبب پاسخ ایمنی و یا باعث آشکار شدن پپتید می‌شود. در نتیجه این پروتئین ها به شکل آنتی ژن توسط لنفوسیت های B و T شناخته می‌شوند. 3- وجود مهارکننده‌های طبیعی پروتئازی در محتویات تخم و همچنین محیط استریل طبیعی و کوچک سیستم تخم، یک محیط ایده‌آل برای ثبات فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌های خارجی ایجاد می‌کند (Rapp et al., 2003). علاوه بر این مطالعات قبلی نشان داده‌اند، برخی پروتئین‌هایی که برای پستانداران سمی هستند، گاهی اوقات فقط می‌توانند در پرندگان تراریخت تولید شوند (Lillico et al., 2007; Zhu et al., 2005). برای مثال، اگر اریتروپویتن انسانی در سیستم پستانی خرگوش بیان شود، اثرات زیان آوری به بار خواهد آورد (Massoud et al., 1996). برای اولین بار در سال 2002 بیان پروتئین بتا لاکتاماز[23] انسانی در جوجه ها آغاز شد (Harvey et al., 2002a). محققان نشان دادند که می‌توان از جوجه‌ها به عنوان راکتورهای زیستی در تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب استفاده مطلوب کرد. تاکنون پروتئین‌های نوترکیب مختلفی مانند انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها، آنزیم‌ها و سیتوکین‌ها با استفاده از جوجه و بلدرچین تراریخت در تخم تولید شده است. همچنین فاکتور پروتئین الحاقی نکروز کننده گیرنده FC تومورها با استفاده از حامل‌های ویروسی به شکل نوترکیب در جوجه ها تولید شده است (Kyogoku et al., 2008). اخیرا پژوهشگران توانستند بیان آنتی‌بادی‌های منوکلونال را در جوجه-ها با موفقیت اجرای کنند. سپس با ذبح جوجه‌های تراریخت با استفاده از آزمون وسترن بلات حضور آنتی‌بادی ها را در بافت‌های مختلف ردیابی کردند (Kamihiraa et al., 2009). به همین ترتیب، لاکتوفرین انسانی به شکل نوترکیب در جوجه‌های تراریخت تولید شد. پروتئین تولید شده دارای فرم گلیکوزیله و مشخصات فیزیولوژیکی یکسانی با لاکتوفرین بدست آمده ازشیر انسان بود. همچنین پژوهشگران نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین تولید شده در این سیستم با لاکتوفرین خالص شده از شیر انسان

23 β-lactamase

Archive of SID

www.SID.ir

یکسان است (Tutykhina et al., 2009). پیشرفت های اخیر در فن‌آوری جوجه های تراریخت و نتایج اولیه بیان پروتئین ها در پرندگان دلگرم کننده می‌باشد (جدول 2). امید به توسعه پرندگان تراریخت برای تولید پروتئین های درمانی به شکل تجاری، در چند سال آینده به واقعیت تبدیل خواهد شد. شرکت‌های بزرگ زیست فناوری به شکل فعالانه به دنبال تحقق این هدف هستند. هنوز تعداد زیادی سوال بی‌جواب باقی مانده است که می‌بایست به آنها در سطح تولید پروتئین، تغییرات بعد از ترجمه و خالص سازی استاندارد جواب داد و سپس آن را به تصویب سازمان‌های نظارتی رساند.

با توجه به تحقیقات انجام شده قبلی، دو روش برای تولید پروتئین های نوترکیب در تخم وجود دارد. انتقال ژن مورد نظر به سلول های اویداکت یکی از این روش هاست (Kawabe et al., 2008; Lillico et al., 2007). این روش شامل استفاده از پرموتورهای خاص بافت مثل پروموتور ovalbumin یا پروموتورهای ساختمانی می‌باشد. روش دیگر تولید پروتئین‌های هدف دارای ناحیه Fc یک آنتی‌بادی درون خون می‌باشد، که باعث تجمع پروتئین‌ها درون زرده از طریق انتقال LgY می‌شود (Kamihiraa et al., 2009; Kyogoku et al., 2008). اگر چه که در روش دوم پروتئین‌های هدف ممکن است به آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های ادغامی Fc محدود شده باشند، اما روش موثری برای افزایش و بهبود پروتئین بدون به خطر انداختن پرنده می‌باشد.

کاربردهای دیگر

ژنوم جوجه‌ها به شکل گسترده‌ای برای بررسی بیماری‌های خود ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rose, 1994). زیرا مارکرهای ژنتیکی، تفکیک پذیری بالایی از نقشه لینکاژی لوکوس‌های ناحیه خاصی از کروموزوم که ویژگی‌های فنوتیپی را کنترل می‌کنند، نشان می‌دهند. جوجه‌ها مدل‌های بسیار ایده‌آلی برای جراحی‌های کوچک چشم، توسعه رویان، تشکیل اندام، ساختار رگ‌های خونی و توسعه و عملکرد سلول‌های B می‌باشند (Kohonen et al., 2007; Leng et al., 2004). جوجه‌ها همچنین برای آدنوکارسینوم تخمدان[24]، که یکی از بزرگترین دلایل سرطان در زنان می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Stammer et al., 2008). همچنین پژوهشگران نشان دادند که جوجه‌ها مدل‌های حیوانی بسیار مناسبی برای تحقیقات بر روی تصلب شرائین[25] هستند. زیرا سطح لیپوپروتئین موجود در آن‌ها بسیار مشابه انسان می‌باشد (Ayala et al., 2005). پیشرفت‌های اخیر در زیست فناوری سبب تولید جوجه‌های تراریخت به منظور مطالعه رشد آن‌ها، مقاومت در برابر بیماری‌ها و سرطان‌ها شده است. توانایی تولید

24 Ovarian Adenocarcinoma

25 Atherosclerosis

Archive of SID

www.SID.ir

حیوانات تراریخت مقاوم به نوع خاص پاتوژن به دلیل کاهش هزینه‌های مرتبط با درمان و ضررهای ناشی از بیماری، دارای اهمیت بسیار بالایی می-باشد. برای مثال، پس از تشخیص ژن Mx در جوجه‌ها پژوهشگران توانستند با وارد کردن و بدست آوردن بیان بالا از این ژن، سطح مقاومت در برابر ویروس آنفلونزا را افزایش دهند (Li et al., 2007). تولید پرندگان تراریخت به شکل صنعتی می‌تواند سبب بهبود ژنوتیپ های موجود، افزایش راندمان غذای مصرفی و کاهش چربی و کلسترول تخم شود (Mohammadabadi, 2007).

جدول 2- بیان موفق پروتئین های نوترکیب با استفاده از حامل های ویروسی.

Table 2 – Successful expression of the recombinant proteins using viral vectors.

پروتئین ***Protein***	حامل ***Vector***	محل بیان ***Expression Place***	منبع ***Reference***
لاکتوفرین ***Lactoferrin***	آدنوویروس ***Adenovirus***	مایع آلانتوئیک ***Allantoic Fluid***	Tutykhina et al., 2009
آنتی بادی منوکلونال ***Monoclonal antibody***	رتروویروس ***Retroviral***	سفیده و زرده تخم ***Egg white & Yolk***	Kamihira et al., 2009
بتا اینترفرون ***β-interferon***	آدنوویروس ***Adenovirus***	کشت سلول ***cell culture***	Cherentaeva et al., 2008
فاکتور نکروز کننده تومور ***Tumor Necrosis Factor***	رتروویروس ***Retroviral***	زرده تخم و سرم ***Egg white & Yolk***	Kyogoku et al., 2008
اریتروپویتین ***Erythropoietin***	رتروویروس ***Retroviral***	سفیده تخم ***Egg white***	Kodama et al., 2008
پروتئین الحاقی تک زنجیره ای Fv-Fc ***Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein***	رتروویروس ***Retroviral***	سرم و سفیده تخم ***Serum & Egg white***	Masamichi et al., 2005
بتا گالکتوزیداز ***β-galactosidase***	رتروویروس ***Retroviral***	سفیده تخم ***Egg white***	Mozdziak et al., 2003
بتا لاکتاماز ***β-lactamase***	رتروویروس ***Retroviral***	سفیده تخم ***Egg white***	Harvey et al., 2002b

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

ویژگی‌های بسیار مناسب جوجه‌ها سبب شده که طی یک ده اخیر از آن‌ها برای ایجاد تراریخت‌ها و زیست شناسی تکاملی استفاده شود. فناوری‌های مورد نیاز برای تولید پرندگان تراریخت و روش‌های دستکاری تراریخت‌ها و بیان ژن در طی دهه گذشته توانسته پیشرفت‌های بزرگی را در صنعت پرندگان ایجاد کند. بررسی‌ها انجام شده در این مقاله نشان داد که جوجه‌ها مدل حیوانی مناسبی برای بررسی بسیاری از بیماری‌های انسانی هستند، اما جوجه‌های تراریخت می‌توانند به عنوان مدل مناسب‌تری برای پژوهش‌های خاص دارویی و زیست فناوری مورد استفاده قرار گیرند. هنوز مشکلات عمده‌ای باقی مانده، که باید قبل از تولید پرندگان تراریخت به آنها توجه ویژه و راهکارهای مناسبی برای آنها پیشنهاد نمود. تحقیقات انجام شده بر روی تراریخت‌ها همگی بر روی انتخاب حامل مناسب برای انتقال موفق ژن مورد نظر تاکید دارند، زیرا سیستم پرندگان از نظر سلولی با پستانداران تفاوت کمی دارند. اما تقریبا تمامی محققین بر این عقیده هستند که جوجه‌های تراریخت ابزاری قدرتمند و مفید برای تحقیقات در حوزه زیست فناوری محسوب می‌شوند. به طور کلی تصور براین است که BDCs کشت داده شده برای مدت طولانی، می‌تواند به سلول‌های شبه ESC تبدیل شود. اما تاکنون گزارشی مبنی بر تولید سلولهای زایای شیمر با استفاده از سلول‌های شبه ESC وجود ندارد. علاوه بر این مشکلات، ممکن است نگرانی‌های روز افزون امنیت محصولات بدست آمده از پرندگان تراریخت، کاربرد عملی برخی از فناوری‌های کارآمد و مفید را برای استفاده از ویروس‌ها در آینده محدود کند. با توجه به سلول های هدف مختلف و روش های انتقال ژن در دسترس، ما معتقدیم هدف قرار دادن SSCs در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از انتقال ژن بر اساس غیر ویروسی و تزریق مجدد آن‌ها درون بیضه خروس مؤثر و کم هزینه ترین روش برای تولید پرندگان تراریخت می‌باشد. اما نمی توان از PGCSها و سلول های بنیادی پرتوان به پاس ویژگی‌های منحصر به فردشان در بهبود و افزایش راندمان تراریخت ها چشم پوشی نمود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقایان پروفسور لی و هان به پاس زحمات و مشاوره‌های خردمندانه، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. همچنین از همکاران محترم جناب آقایان دکتر مجتبی طهمورث پور، دکتر احمد رضا بهرامی و دکتر حسام دهقانی که در بحث های علمی مقاله مروری همکاری شایسته ای داشتند صمیمانه سپاسگزاریم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Allioli N, Thomas J, Chebloune Y, Nigon V, Verdier G, Legras C (1994). Use of retroviral vectors to introduce and express the b-galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. Developmental Biology 165:30-37.

Aritomi S, Fujihara N (2000). Production of chicken chimeras by fusing blastodermal cells with electroporation. Asian Journal of Andrology 2:271-275.

Ayala I, Pérez BG, Doménech G, Castells MT, Valdés M (2005). Use of the Chicken as an Experimental Animal Model in Atherosclerosis. Avian and Poultry Biology Reviews 16:151-159.

Bednarczyk M, Lakota P, Siwek M (2000). Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastodermal cells. Poultry Science 79:1823–1828.

Borwornpinyo S, Brake J, Mozdziak PE, Petitte JN (2005). Culture of Chicken Embryos in Surrogate Eggshells. Poultry Science 84:1477–1482.

Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, Kozar L, Martin F, Green C, Jacobsen F, Nicholson M, Schultz JA, Semon KM, Rishell W, Stewart G, Scangos A (1989a). Germline transmission of exogenous genes in the chicken. Science 243:533–535.

Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, Souza L, Kozar L, Martin F, Nicolson M, Rishell W, Schultz J, Simon K, Stewart RG (1989b). Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo. Journal of Virology 63:2680–2689.

Brinster RL, Avarbock MR (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91:11303–11307.

Brinster RL, Zimmermann JW (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91:11298–11302.

Carsience RS, Clark ME , Verrinder Gibbins AM, Etches RJ (1993). Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. Development 117:669–750.

Chapman SC, Lawson A, MacArthur WC, Wiese RJ, Loechel RH, Burgos-Trinidad M, Wakefield JK, Ramabhadran R, Mauch TJ, Schoenwolf GC (2005). Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. Development 132:935-940.

Cherentaeva EA, Logunov DIU, Verkhovskaya LV, Mezentseva MV, Shmarov MM, Ershov FI, Naroditskii BS, Gintsburg AL (2008). Production of the human β-interferon recombinant protein in avian cell culture Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologia, I Virusologia 23:153-157.

Archive of SID

www.SID.ir

Cockrell AS, Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. Molecular Biotechnology 36:18-204.

Dodgson JB (2007). The chicken genome: some good news and some bad news. Poultry Science 86:1453-1459.

Dunn DA, Kooyman DL, Pinkert CA (2005). Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. Drug Discoveries & Therapeutics 10:757-767.

Eyal-Giladi H, Kochav S (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: General morphology. Developmental Biology 49:321–337.

Furuta H, Fujihara N (1999). Proliferation of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan treated chicken embryos. Asian journal of andrology 1:187-190.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77:7380-7384.

Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL (2005). Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102:17430-17435.

Han JY (2009). Germ cells and transgenesis in chickens. Microbiology and Infectious Diseases 32:61–80.

Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie RI (2002a). Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high throughput screening procedures. Poultry Science 81:202–212.

Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie RI (2002b). Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. Nature Biotechnology 20:396–399.

Jung JG, Lee YM, Park TS, Park SH, Lim JM, Han JY (2007). Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. Biology of Reproduction 76:173–182.

Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T, Naito M (1997). The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donorderived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. Molecular Reproduction and Development 48:501–510.

Kamihiraa M, Kawabea Y, Shindob T, Onoc K, Esakac K, Yamashitab T, Nishijimac K, Iijima S (2009). Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. Journal of Biotechnology 141:18–25.

Kamihiraa M, Ono K, Esaka K, Nishijima R, Kigaku R, Komatsu H (2005). High-level expression of singlechain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically modified chickens by using a retroviral vector. Journal of Virology 79:10864–10870.

Archive of SID

www.SID.ir

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Mili H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003). Long-term proliferation in culture and gremlin transmission of mouse male germline stem cells. Biology of Reproduction 69:612-616.

Kawabe YNT, Komatsu H, Nishijima K, Iijima S, Kamihira M (2008). Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. Journal of Bioscience and Bioengineering 106:598-601.

Kodama D, Nishimiya D, Iwata K, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motono M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K, Kamihira M, Iijim AS (2008). Production of human erythropoietin by chimeric chickens. Biochemical and Biophysical Research 367:834-839.

Kohonen P, Nera KP, Lassila O (2007). Avian Model for B-Cell Immunology – New Genomes and Phylotranscriptomics. Scandinavian Journal of Immunology 66:113–121.

Kulesa PM, Bailey CM, Cooper C, Fraser SE (2010). In Ovo Live Imaging of Avian Embryos. Cold Spring Harbor Protocols 6:5446.

Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T (2004). Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. Biochemical and Biophysical Research 320:442–448.

Kyogoku k, Yoshida K, Watanabe H, Yamashita T, Kawabe Y, Motono M, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S (2008). Production of Recombinant Tumor Necrosis Factor Receptor/Fc Fusion Protein by Genetically Manipulated Chickens. Bioscience And Bioengine Ering 105:454–459.

Lee YM, Jung JG, Kim JN, Park TS, Kim TM Shin SS (2006). A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. Biology of Reproduction 75:380–386.

Leng TH, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, huie P, Blumenkranz MS (2004). The chich chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. Journal of Retinal and Vitreous Diseases 24:427–434.

Li BC, Sun GB, Sun HC, Xu Q, Gao B, Zhou GY, Zhao WM, Wu XS, Bao WB, Yu F, Wang KH, Chen GH (2008). Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo andm ex vivo transfection. Science in China Press 51:734-742.

Li XY, Qu LJ, Hou ZC, Yao JF, Xu GY, Yang N (2007). Genomic structure and diversity of the chicken Mx gene. Poultry Science 86:786–789.

Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard C, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. Proceedings of the National Academy of Science USA 104:1771-1776.

LillicoSG, McGrew JM, Sherman A, Sang HM (2005). Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. Drug Discoveries & Therapeutics 10:191-196.

Archive of SID

www.SID.ir

Lim JM, Kwon HM, Kim DK, Kim JN, Park TS, Ono K (2006). Selective decrease of chicken embryonic primordial germ cells in vivo and in vitro by soft X-ray Irradiation. Anim. Animal Reproduction Science. 95:67-74.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore DB (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of trangenes delivered by lentiviral vectors. Science 295:868–872.

Love J, Gribbin C, Mather C, Sang H (1994). Transgenic birds by DNA microinjection. Biotechnology 12:60-63.

Maeda T, Yamakawa Y, Masuda K, Terada T (1997). Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs. British Poultry Science 38:38: 241-242.

Masamichi K, Ken-ichiro O, Kazuhisa E, Ken-ichi N, Hiroyuki K, Takashi Y, Kenji K, Shinji I (2005). High-Level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. Journal of Virology 79:10864-10874.

Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM (1996). The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. Reproduction Nutrition Development 35:555-563.

McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Reports 5:728–733.

Mizuarai S, Ono K, Yamaguchi K, Nishijima K, Kamihira M, Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H (2001). Production of transgenic quails with gigh frequency of germ-Line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications 286:456-463.

Mohammadabadi MR (2007). Biotechnology and future of transgenic animals. Proceeding of the Environment and stable development of agriculture congress. Research centre of Jahad-e-Keshavarzi of Kerman, Kerman, Iran 142-158. (In Persian)

Mohammadabadi MR (2008). Reception methods of transgenic poultry. Proceeding of 2nd National Congress of Cellular and Molecular Biology, Kerman, Iran 317-321. (In Persian)

Motono M, Yuki Y, Yuki H, Ryo N, Nishijima K, Shinji I (2010). Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. journal of Bioscience and Bioengineering 109:315-321.

Mozdziak PE, Borwornpinyo S, McCoy DW, Petitte JN (2003). Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. Developmental Dynamics 226:439–445.

Mozdziak PE, Wysocki R, Stewart JA, Pardue SL, Petitte JN (2006). Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cellsorted gonocytes. Poultry Science 85:1764-1768.

Archive of SID

www.SID.ir

Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T (2007). Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. Poultry Science 86:2182-2193.

Ono T, Muto SI, Mizutani M, Agata K, Mochii M, Kino K, Otuska K, Ohata M Yoshida M, Eguchi G (1994). Production of quail chimera by transfer of early blastodermal cells and its use for transgenesis. Poultry Science 31:119-129.

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches R (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. Development 122:2339-2348.

Park F (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis. Physiological Genomics 31:159–173.

Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM (2003). Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. Biology of Reproduction 68:1657–1662.

Perry MM (1988). A complete culture system for the chick embryo. Nature 331:70–72.

Petitte JN, Clark ME, Liu G, Gibbins AMV, Etches R (1990). The production of somatic and germline chimeras in the chick by transfer of early blastodermal cells. Development 108:185–190.

Petitte JN, Liu1G, Yang Z (2004). Avian pluripotent stem cells. Mechanisms of Development 121:1159–1168.

Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM (2002). Trangenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos.Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99:2140–2145.

Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones A (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. Glycobiology 10:477-486.

Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R (2003). Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens. Transgenic Research 12:569-575.

Robert I (2006). Competitive bioreactor hens on the horizon. Trends in Biotechnology 24:99-101.

Rose NR (1994). Avian models of autoimmune disease: lessons from the birds. Poultry Science 73:984-990.

Rowlett KA, Simkiss K (1987). Explanted embryo culture: in vitro and in vivo techniques for domestic fowl. Poultry Science . 28:91–101.

Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Fadly AM, Witter RL, Crittenden LB (1986). Gene insertion into the chicken germline by retroviruses. Poultry Science 65:1445–1458.

Archive of SID

www.SID.ir

Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H (1998). Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line. Nature Biotechnology 16:1050–1053.

Speksnijder G, Ivarie R (2000). A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilized chicken eggs. Poultry Science 79:1430-1433.

Stammer K, Edassery SL, Barua A, Bitterman P, Bahr JM, Hales DB, Luborsky JL (2008). Selenium-Binding Protein 1 expression in ovaries and ovarian tumors in the laying hen, a spontaneous model of human ovarian cancer. Gynecologic Oncology 109:115–121.

Suraeva NM, Byryshnikov AY, Fisinin VI, Prokofiev MI (2008). A study of the efficiency of different methods to transfer a reporter gene to chicken embryonic cells. Biology Bulletin 35:12-16.

Tutykhina IL, Bezborodova OA, Shmarov MM, Logunov DY, Neugodova GL, Nemtsova ER, Naroditsky BS, Yakubovskaya RI, Gintsburg AL (2009). Production of recombinant human lactoferrin in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs and its characteristics. Protein Expression and Purification 65:100–107.

Van de Lavoir MC, Christine ML, Philip L, Jennifer HD, Babette SH, Rhys R, Lei Z, Peggy WD, Allyn K, Terri G, Susan S, Mary ED, Robert JE (2006). High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. Mechanisms of Development 123:31-41.

Vick L, Li Y, Simkiss K (1993). Transgenic birds from transformed primordial germ cells Proceedings. Biological sciences 251:179–182.

Wang YL, Brooks CF, Jones SA, Olliff LK, Morgan M, Speksnijder GL, Foley C, Harvey AJ (2006). Progress Toward the Culture and Transformation of Chicken Blastodermal Cells. Stem Cells 24:1638-1645.

Yu F, Ding LJ, Sun GB, Sun PX, He XH, Ni LG, Li BC (2010). Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. Molecular Reproduction and Development 77:340-347.

Zhu L, van de Lavoir MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Pina MC, Severino C, David FD, Shrikant D, Jennifer HD, Lynae G, Edward LH, Babette SH, Robert MK, Allyn K, Philip AL, Christine MM, Sherie LM, Zivko LN, David BP, Alicia PM, Benjamin TP, Vangipuram SR, Mingxia S, Mohan S, Steven GW, Peggy WD , Susan W, Wen Z, Robert JE (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. Nature Biotechnology 23:1159-1169.

Archive of SID

www.SID.ir

The generating methods of transgenic chickens and its potential application in biotechnology

Nassiry M.R.[1], Ghovvati S.[2*], Mohammadabadi M.R.[3], Ariannezhad H.[2], Doosti M.[2]

[1] Associate Professor, Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Ph. D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, P. O. Box: 91775-1163, Iran
[3] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

During the last decades, potential of genetic modifications at the molecular level has created great revolution in biology. Transgenic technology has provided the possibility of connection between different techniques in field of embryology, cellular biology and molecular genetics. Nowadays, transgenic chicken are used as efficient research tools in many institutions. So, many researchers believe that before any research in the field of genetic manipulation, these methods should be optimized. Regarding to the remarkable progress of biotechnology, direct manipulation of chicken embryo by DNA or viral vectors is possible but generally, using this methods can not create a specific site and target genes for genetic manipulation. To fix this problem, recently, many scientists have proposed and improved different methods to generate transgenic chickens based on Blastodermal cells (BDCs), Embryonic stem cells (ESCs), Primordial germ cells (PGCs) and Spermatogonial stem cells (SSCs). By the way, recently the complicated system for the isolation, expansion, transfection, selection and re-expansion embryonic stem cell cultures and the subsequent production of high-grade somatic chimeras was improved and their results were published in scientific papers. In recent years, the results of several studies have shown testicular culture method from spermatogonial somatic cells (SSCs) is the newest, easiest and most efficient method of transgenic chicken generation. This method has been used biological process of sperm production and SSCs as inducer in transgenic chicken. Although, use of the viral systems can be lead to gene transfer with high efficiency, but the safety issues limited its practical applications. Nowadays, the methods of chimeras germ cells production and pluripotent stem cells manipulation are combined and used to generate transgenic birds. This review has attempted to describe the most important methods of generating transgenic chickens, the methods of gene transfer and also the application of transgenic chickens as bioreactor in biology.

Keywords: *Transgenic chickens, Gene transfer, Genetic manipulation, Pluripotent cells, Viral vectors and Stem cells.*

[*] Corresponding Author: Ghovvati S. Tel: 05118795618 Email: *Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir