Original Article

Selection of the Most Appropriate Medium for Assessing Motility and DNA Uptake of Bovine Spermatozoa

Sh. Eghbalsaied, M.Sc.[1], K. Ghaedi, Ph.D.[2, 3*], SM. Hosseini, D.V.M.[2], S. Tanhaie, M.Sc.[2], M. Forouzanfar, Ph.D.[4], M. Hajian, M.Sc.[2], NA. Mozafari, Ph.D.[5], MH. Nasr Esfahani, Ph.D.[2*]

1. Animal Sciences Department, Agriculture and Natural Resources College, Science and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Clinical and Experimental Embryology Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, (Isfahan Campus), Isfahan, Iran
3. Biology Department, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. School of Sciences, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
5. Microbiology Department, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 8158968433, Clinical and Experimental Embryology Department, Cell Sciences Researh Center, Royan Institute, (Isfahan Campus), Isfahan, Iran***
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Abstract

Received: 15/Jan/2008, Accepted: 21/May/2008

Objective: The aim of this study was to select the best medium to maintain sperm motility during sperm-DNA incubation and assess the DNA uptake by spermatozoa of Iranian Holstein bulls and its effects on sperm motility.

Materials and Methods: frozen sperms from an Iranian Holstein bull were thawed and centrifuged. Motile sperms were separated through Puresperm gradient (40/80%) followed by two times washing in SP-TALP medium. Then, sperms were washed once (PBS, Opti-MEM and SP-TALP) and incubated with DNA in each media followed by sperm motility estimation. The plasmid pEGFP-C1 was linearized and incubated with sperms at 37°C for 1 hour. Sperm-DNA mixture was treated with *DNase* I and the sperm pellet was washed with PBS.

DNA extraction from sperms and supernatants from the last washing were used as template for PCR. Data was analyzed using SAS package and mean comparisons between sperm motility in different media were performed.

Results: Sperm motility after incubation in PBS, Opti-MEM and SP-TALP were 40(±2.89), 2(±1.53) and 54(±4.41) percent, respectively. PCR results from transfected sperms indicated that EGFP transgene internalized into the bovine sperms and DNaseI treatment could not eliminate it.

Conclusion: In conclusion the best medium for sperm and DNA incubation was SP-TALP. The DNA not only could attach to the post acrosomal region of spermatozoa but also could integrate into it. So bovine spermatozoa can be used as transgene carrier into oocyte.

Keywords: Transfection, Sperm Motility, Transgene, EGFP, PCR

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 266-271

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه محیط‌های رایج به منظور بررسی میزان تحرک و توانایی اسپرم گاو در جذب DNA

شاهین اقبال‌سعید M.Sc.[1]، کامران قائدی Ph.D.[2,3]، سید مرتضی حسینی D.V.M.[2]، سمیه تنهایی M.Sc.[2]، محسن فروزانفر Ph.D.[4]، مهدی حاجیان M.Sc.[2]، نورامیر مظفری Ph.D.[5]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[2*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، تهران، ایران
۲. پژوهشکده رویان، (پایگاه تحقیقاتی اصفهان)، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه جنین شناسی، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، دانشکده علوم پایه، مرودشت، ایران
۵. دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، اصفهان، صندوق پستی: ۸۱۵۸۹۶۸۴۳۳، پژوهشکده رویان (پایگاه تحقیقاتی اصفهان)، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و گروه جنین شناسی
پست الکترونیک: Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۱

* **هدف:** انتخاب محیط مناسب برای انکوباسیون اسپرم و DNA از نظر درصد تحرک اسپرم و ارزیابی توانایی اسپرم گاوهای نر هلشتاین ایرانی در جذب DNA در این محیط

* **مواد و روش‌ها:** اسپرم‌های منجمد شده یک گاو نر هلشتاین ایرانی، ذوب گردید. اسپرم‌های متحرک با روش گرادینت Puresperm (۸۰/۴۰ درصد) جدا شده و با محیط SP-TALP دو بار شسته شدند. سپس اسپرم‌ها با یکی از محیط‌های Opti-MEM، PBS و SP-TALP یک بار شست‌وشو داده شده و انکوباسیون اسپرم و ترانس ژن در این محیط‌ها به مدت یک ساعت انجام گرفت. پلاسمید خطی شده pEGFP-C1 به مدت یک ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد با 10^6 با اسپرم‌ها انکوبه شدند. مخلوط اسپرم و DNA با استفاده از آنزیم *DNase I* تیمار شده و شست‌وشوی آنها با PBS انجام گردید. DNA استخراج شده از اسپرم‌ها و از مایع رویی آخرین مرحله شست‌وشوی اسپرم، جهت انجام PCR استفاده گردیدند. آنالیز و مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در محیط‌های مختلف با استفاده از آزمون دانکن و نرم افزار SAS0 انجام شد.

* **یافته‌ها:** درصد تحرک اسپرم‌ها در محیط‌های Opti-MEM، PBS و SP-TALP به ترتیب (۲/۸۹±) ۴۰، (۱/۵۳±)۲ و (۴/۴۱ ±)۵۴ بود. نتایج PCR با استفاده از DNA استخراج شده از اسپرم‌های ترانسفکت شده نشان داد که ترانس‌ژن وارد اسپرم شده و تحت اثر هضم آنزیمی حذف نشده است.

* **نتیجه گیری:** این آزمایش نشان داد که بهترین محیط برای انکوباسیون اسپرم و DNA از نظر درصد تحرک اسپرم، محیط SP-TALP است. ترانس‌ژن علاوه بر توانایی اتصال به غشای اسپرم گاوهای هلشتاین ایرانی، توانایی جذب به داخل آن را نیز دارد و بنابراین می‌توان از این اسپرم‌ها به عنوان ناقل ترانس‌ژن به تخمک استفاده کرد.

* **کلیدواژگان:** ترانس‌فکشن، تحرک اسپرم، ترانس‌ژن، EGFP، PCR

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ٤، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۷۱-۲۶۶

مقدمه

تاریخچه تولد حیوانات ترانس‌ژنیک از ۷۲ سال پیش توسط گوردون پایه‌گذاری شد (۱). اگرچه تکنیک میکرواینجکشن (Microinjection) اولین تکنیکی بود که جهت ایجاد حیوانات ترانس‌ژنیک استفاده شد، ولیکن بازدهی این روش از اولین مطالعات تاکنون و در گونه‌های مختلف حیوانی کمتر از یک درصد گزارش شده است (۲). از طرف دیگر، ترانس‌ژن در پیش‌هسته و هسته باقی می‌ماند و کپی‌های به هم پیوسته با تعداد متفاوتی ایجاد می‌کند که قادرند در مراحل مختلف تکثیر سلولی وارد بخش‌های مختلف ژنوم میزبان شوند و به همین دلیل اغلب حیوانات ترانس‌ژنیک ایجاد شده موزاییک هستند (۲، ۳). برای افزایش بازدهی ترانس‌ژنریز از ویروس‌های دسته لنتی ویروس‌ها در گونه‌های مختلف با موفقیت استفاده شده است (۶-۴). با این وجود، این تکنیک دارای عیب‌های متعددی از جمله میزان بالای مرگ و میر جنین‌ها و محدودیت طول ترانس‌ژن قابل انتقال است. به علاوه، امکان ایجاد آلودگی توسط این ویروس‌ها باعث شده بسیاری از آزمایشگاه‌ها تمایلی به استفاده از آن نشان ندهند (۷، ۸).

براکت و همکاران، اولین گروهی بودند که توانایی اسپرم پستانداران را در جذب ترانس‌ژن نشان دادند (۹) ولی تا سال ۱۹۸۱ هیچ گزارش دیگری در این زمینه منتشر نشد. لاویترانو و همکارانش توانایی جذب ترانس‌ژن توسط اسپرم موش را گزارش کردند (۱۰). تلاش برای تکرار این روش در آزمایشگاه‌های مختلف و امکان استفاده از این روش به طور موثر تا چندین سال ناکام ماند (۱۳-۱۱). سپس گروه‌های دیگری نشان دادند که ترانسژن به ناحیه پشت آکروزومی اسپرم در گونه‌های مختلف متصل می‌شود (۱۶-۱۴) و بازدهی این روش نه تنها در گونه‌های مختلف بلکه در بین نژادهای داخل گونه‌ها نیز متفاوت است (۱۷) و از ۵ (۱۸) تا ۸۸ درصد (۱۹) متغیر گزارش شده‌است. این روش برخلاف روش میکرواینجکشن نیاز به تجهیزات خاص و متخصصان ماهر در استفاده از دستگاه ندارد و روش انجام آن بسیار ساده است. در این روش اندازه ترانس‌ژن یک عامل محدود کننده نبوده و ترانس‌ژن‌های با طول بیش از ۲۰۰ کیلوباز نیز با موفقیت به جنین موش منتقل شدند (۲۰). ترانس‌ژن به دلیل داشتن بار منفی توانایی اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در ناحیه پشت آکروزومی اسپرم را

Archive of SID
www.SID.ir

دارد (۱۶-۱۵). مولکول‌های بزرگ دارای بار منفی نظیر هپارین، سولفات دکسترین، آلبومین و سایر پروتئین‌ها نیز قابلیت اتصال به این بخش از اسپرم را دارند. به همین دلیل، در حضور این پروتئین‌ها بین ترانس‌ژن و پروتئین‌ها جهت اتصال به اسپرم رقابت ایجاد می‌شود و بهتر است که این پروتئین‌ها از محیط انکوباسیون حذف شوند (۲۱). مدت زمان انکوباسیون به محیط مورد استفاده برای شست‌وشوی اسپرم، محیط انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن تعداد دفعات شست‌وشوی اسپرم و اندازه ترانس‌ژن بستگی دارد (۷، ۲۲). این مدت زمان برای اسپرم‌های انسان ۲۰ دقیقه (۲۲)، گاو از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه (۲۳، ۲۴)، موش از ۲ تا ۳۰ دقیقه (۲۰، ۲۵) و در خوک از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه (۲۲) متغیر بوده‌است.

در مطالعات مختلف از محیط‌های مختلفی برای انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن استفاده شده است (۳۱-۲۳). براین اساس، تعیین یک محیط مطلوب برای انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن که اسپرم‌ها بتوانند تحرک خود را در آن محیط حذف کرده و جذب ترانس‌ژن توسط آنها نیز به خوبی انجام شود، ضروری به نظر می‌رسید. در مطالعه کنونی، تاثیر سه محیط کشت مورد استفاده در انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن (Opti-، PBS MEM و SP-TALP) بر میزان تحرک اسپرم و نیز امکان جذب ترانس ژن EGFP توسط اسپرم گاوهای هلشتاین ایرانی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت SIG-MA تهیه شده و در غیر این‌صورت نام شرکت سازنده ذکر شده است.

آماده‌سازی پلاسمید

پلاسمید pEGFP-C1(Clontech)، دارای ژن EGFP تحت کنترل پروموتور CMV و نیز ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، طبق روش استاندارد ترانسفورماسیون (۳۲) به باکتری *E.coli* منتقل و باکتری‌ها جهت رشد در محیط حاوی کانامایسین کشت داده شدند. کلونی‌های ایجادشده در تیوب‌های حاوی محیط کشت وآنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰ دور به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند (۳۲). استخراج پلاسمید از باکتری‌ها به وسیله کیت (QIAprep, miniprep, QIAGEN) انجام‌شد. پلاسمیدها توسط آنزیم محدودکننده SsPI (Fermentas) بریده شده و قطعه بزرگتر (۴۱۰۰ جفت باز) به وسیله کیت استخراج DNA از روی ژل (QIAquick Gel extraction, QIAGEN) جدا و در بافر Tris-EDTA ۱۰ میلی‌مولار رقیق شد.

آماده‌سازی اسپرم

تاثیر سه محیط
PBS (125 mM NaCl, 2mM NaH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 5 mM KCl, 5mM Glucose), Opti-MEM (GIBCO), SP-TALP عاری از BSA که طبق روش Parrish و همکارانش تهیه شده بود (۳۳)، بر درصد تحرک اسپرم‌های یک گاو نر هلشتاین ایرانی بررسی شد. در هر بار آزمایش از سه پایوت اسپرم‌های منجمد شده استفاده شد. پایوت‌های اسپرم به مدت ۳۰ ثانیه در آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شده و در دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی بیرون ریخته شد و اسپرم‌های رسوب یافته به آرامی بر روی گرادینت PureSperm (۴۰/۸۰ درصد) قرار گرفته و با سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، اسپرم‌های متحرک جدا شدند. اسپرم‌های رسوب یافته به یک لوله جدید منتقل شده و پس از دو بار شست‌وشو با محیط SP-TALP در دور ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، به یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و سانتریفیوژ مجددا تکرار شد. تحرک اسپرم‌ها قبل از تیمار در محیط‌های جدید ارزیابی و تعداد 1×10^6 اسپرم به سه تیوب جداگانه منتقل شد. یک میلی‌لیتر از محیط‌های Opti-MEM، PBS و SP-TALP به هر تیوب اضافه و سانتریفیوژ اسپرم‌ها مجددا در دور ۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه تکرار شد. پس از شست‌وشوی اسپرم‌ها، انکوباسیون آنها با ۱ میکروگرم از ترانس‌ژن خطی‌شده در ۰/۱ میلی‌متر از محیط‌های ذکرشده به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انجام گرفت. پس از پایان انکوباسیون، درصد اسپرم‌های دارای تحرک پیش‌رونده P3 و P4 در هر کدام از محیط‌ها در زیر میکروسکوپ برآورد شد. این آزمایش سه بار در شرایط مشابه تکرار شد.

ترانس فکشن اسپرم

مراحل آماده‌سازی اسپرم مشابه قبل بود و اسپرم‌های متحرک ابتدا با روش گرادینت Puresperm (۴۰/۸۰ درصد) جدا و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و انتقال به یک تیوب ۱/۵ میلی‌متر با استفاده از محیط SP-TALP شست‌وشو داده شدند. شست‌وشوی اسپرم‌ها در همان شرایط قبلی مجددا تکرار شد. تعداد 1×10^6 اسپرم در یک تیوب جدید که حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر محیط SP-TALP و یک میکروگرم از پلاسمید خطی‌شده pEGFP-C1 بود، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. برای حذف پلاسمیدهای اضافی موجود در محیط و نیز حذف پلاسمیدهای متصل شده به سطح اسپرم که توانایی جذب اسپرم نداشتند، پس از پایان زمان انکوباسیون، کل اسپرم‌ها به دو گروه تقسیم شدند. سه واحد آنزیمی *DNase* I (Fermentas) به یک گروه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون آن انجام گرفت. گروه دیگر تحت تاثیر آنزیم *DNase*I قرار نگرفت. اسپرم‌های هر دو گروه با استفاده از PBS سرد عاری از کلسیم و منیزیم در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سه بار شست‌وشو داده شدند تا DNAهای موجود در محیط حتی‌الامکان حذف شوند. حدود ۵۰۰ میکرولیتر از محیط رویی اسپرم‌ها در آخرین مرحله شست‌وشو به یک تیوب ۰/۵ میلی‌لیتر منتقل شدند و برای غیرفعال شدن آنزیم *DNase* I به مدت ۱۰ دقیقه تحت دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این نمونه به عنوان کنترل منفی ترانس فکشن اسپرم در PCR استفاده شد.

استخراج DNA از اسپرم

مراحل استخراج DNA از اسپرم به طور خلاصه به صورت زیر بود: ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر از یک بافر لیزکننده (PH=۸، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۰/۵ درصد SDS و ۲ درصد Mercaptoethanol) به ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی اسپرم‌ها افزوده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پنج میکرولیتر پروتئیناز K (Fermentas)، غلظت نهایی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به این مخلوط اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سایر مراحل استخراج DNA طبق روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام شد. تمامی مراحل سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد (۳۲).

واکنش PCR

برای مشخص‌کردن ورود ترانس‌ژن به داخل اسپرم از واکنش PCR استفاده شد (۳۲). واکنش PCR برای DNA استخراج شده از دو گروه اسپرم تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم *DNase* I، مایع رویی از هر دو گروه اسپرم‌ها در آخرین مرحله شست‌وشوی اسپرم به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

کنترل منفی ترانس فکشن اسپرم و نیز کنترل منفی واکنش PCR که فاقد DNA بود، انجام شد.

کل حجم یک واکنش PCR در هر تیوب ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۲میکرولیتر از نمونه‌های ذکرشده، بافر (PCR سیناژن)، کلرید منیزیوم ۲ میلی‌مولار، پرایمرهای مستقیم و معکوس pmol ۱۰ و آنزیم DNA پلیمراز (SmartTaq، سیناژن) بود. توالی پرایمرهای مستقیم و معکوس EGFP به ترتیب:
3-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-´5 و
3-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-´5 بود.

مراحل واکنش PCR به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و تعداد ۳۵ سیکل به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پنج میکرولیتر از محصول هر واکنش بر روی ژل آگارز ۱درصد قرارگرفت و باندهای ایجاد شده در زیر اشعه ماورای بنفش بررسی شدند.

آنالیز آماری

پس از اطمینان از توزیع نرمال داده‌های صفت درصد تحرک اسپرم با استفاده از نرم افزار SAS (ویرایش ۹/۱)، آنالیز واریانس این داده‌ها با استفاده از رویکرد GLM انجام شد. میانگین تحرک اسپرم و خطای معیار آنها در محیط‌های مختلف برآورد شد و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMR) و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام‌شد.

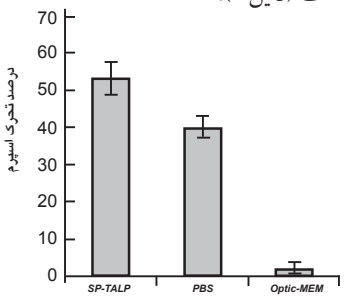
یافته‌ها

انکوباسیون اسپرم و DNA

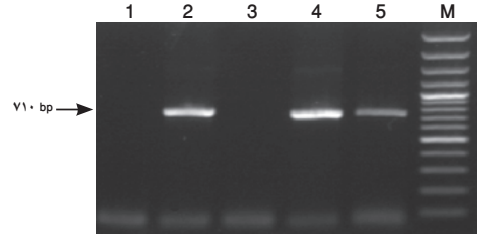
درصد تحرک اسپرم در محیط Opti-MEM نسبت به سایر محیط‌ها کمترین (۱/۳۵±۲) بود و اختلاف معنی‌داری با دو محیط دیگر داشت. درصد تحرک اسپرم در محیط PBS نسبت به سایر محیط‌ها متوسط بود (۲/۹۸±۴۰) و اختلاف معنی‌داری با هر دو گروه دیگر داشت. پس از انکوباسیون اسپرم و DNA در این محیط، بخش زیادی از اسپرم‌ها دارای آگلوتیناسیون و نیز تحرک غیرنرمال (به صورت زنش درجا و ثابت) بودند. درصد تحرک اسپرم در محیط SP-TALP نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین (۴/۱۴±۴۵) بود (نمودار ۱). لذا در آزمایش‌های بعدی از محیط SP-TALP استفاده شد.

استخراج DNA از اسپرم

همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، نتیجه PCR برای مایع رویی اسپرم‌هایی که تحت تاثیر هضم آنزیمی قرار نگرفتند و فقط دو بار شست‌وشو داده شدند، مثبت بود (لاین ۲). این مطلب نشان می‌دهد که شست‌وشوی اسپرم‌ها به تنهایی برای حذف ترانس‌ژن‌های آزاد و یا چسبیده به سطح اسپرم کافی نیست و به همین دلیل، مایع رویی که فاقد اسپرم بود، باند مورد نظر را نشان داد. بنابراین، علی‌رغم مثبت بودن نتیجه PCR از DNA استخراج شده از اسپرم (لاین ۴)، نتایج آن قابل تفسیر نیست. برای اطمینان از ورود ترانس‌ژن به داخل اسپرم، هضم آنزیمی توسط *DNase* I انجام شد تا تمامی ترانس‌ژن‌های آزاد موجود در محیط و یا چسبیده به سطح اسپرم که در معرض اثر آنزیم بودند، حذف شوند. نتیجه PCR از مایع رویی منفی بود (لاین ۳) که موید حذف تمامی ترانس‌ژن‌های آزاد از محیط است. در گروه DNA استخراج شده از اسپرم، باند مورد انتظار ۷۱۰bp مشاهده شد که نشان می‌دهد ترانس‌ژن وارد اسپرم شده است (لاین ۵).



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در سه محیط SP-TALP، PBS و Opti-MEM با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ بار نشان دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۱: نتایج PCR برای گروه کنترل منفی PCR (۱)، مایع رویی گروه هضم آنزیمی نشده (۲)، مایع رویی گروه هضم آنزیمی شده (۳)، DNA استخراج شده از اسپرم‌های هضم آنزیمی نشده (۴)، DNA استخراج شده از اسپرم‌های هضم آنزیمی شده (۵) و مارکر (M) نشان داده شده‌است.

مقایسه باندهای حاصل از DNA استخراج شده از اسپرم‌هایی که تحت اثر هضم آنزیمی قرار گرفته و یا نگرفته بودند، نشان می‌دهد ضخامت باند حاصل از گروهی که تحت اثر هضم آنزیمی قرار نگرفتند، بیشتر از گروه دیگر است. این اختلاف مطابق انتظار و ناشی از عمل هضم آنزیمی است.

بحث

محیط Opti-MEM محیط متداول برای کشت سلول‌ها در آزمایشگاه است. این محیط به علت نداشتن BSA و سایر پروتئین‌های بزرگ، فاقد ممانعت‌کننده‌های اتصال لیپوفکتامین به سطح اسپرم است و برای لیپوفکشن سلول‌ها استفاده می‌شود (۳۴). در مطالعه الدرسون و همکارانش از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در محیط Opti-MEM برای ترانسفکشن اسپرم‌ها استفاده شده است (۲۴)، نتایج بررسی حاضر با این محیط و نیز آزمایش‌های مقدماتی با محیط DMEM نشان داد که این محیط‌ها علی‌رغم مطلوب بودن برای کشت سلول‌های مختلف، برای سلول‌های اسپرم مناسب نیستند و میزان تحرک اسپرم را به کمتر از ۵ درصد کاهش می‌دهند و به همین دلیل این اسپرم‌ها توانایی لقاح آزمایشگاهی ندارند و جهت باروری به استفاده از روش تزریق درون سیتوپلاسمی تخمک نیاز است.

محیط PBS دارای pH=۷/۴ و فاقد بی‌کربنات سدیم است. بنابراین، تنظیم pH آن وابسته به انکوباتور نبوده و از پایداری زیادتری نیز برخوردار است. طبق گزارش ویلیامز و همکارانش، افزودن گلوکز (۵ میلی‌مولار) به محیط‌های مورد استفاده در شست‌وشوی اسپرم باعث افزایش میزان تحرک، ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی اسپرم می‌شود (۳۵) و به همین دلیل در مطالعات مختلف (۲۳، ۲۶) و در مطالعه کنونی

Archive of SID
www.SID.ir

نیز به محیط PBS گلوکز اضافه شده است. درصد اسپرم‌های زنده در این محیط از ۲۵ تا ۳۵ درصد گزارش شده است (۲۳ و ۲۶) که با نتیجه بررسی حاضر مطابقت دارد. پس از انکوباسیون، بخش زیادی از اسپرم‌ها دارای آگلوتیناسیون و نیز تحرک غیرنرمال (به صورت زنش درجا و ثابت) بودند که با نتایج Anzar و همکارانش (۲۳) مطابقت داشت. برای رفع این مشکل، پس از پایان زمان انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن، شست وشوی اسپرم‌ها در محیط SP-TALP (BSA ۰/۶ درصد)، که برای انجام ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها استفاده می‌شود، برای دو بار متوالی انجام گرفت. استفاده از این روش باعث بازگشت تحرک اسپرم‌ها به حالت نرمال شد.

محیط SP-TALP به طور متداول برای لقاح اسپرم و تخمک استفاده می‌شود. در این محیط از BSA با غلظت ۶ میلی گرم در میلی‌لیتر استفاده می‌شود. وجود BSA برای انجام ظرفیت‌پذیری و نیز حفظ تحرک اسپرم ضروری است و باعث افزایش تحرک اسپرم می‌شود (۳۳). پس از انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن در این محیط، تحرک اسپرم‌ها حفظ شد که نشان‌دهنده مطلوب بودن این محیط تغییر یافته است. در مطالعه Hoe-Iker و همکارانش (۲۶) برای ترانس فکشن اسپرم با روش انکوباسیون با DNA لخت شده و نیز FUGEN۶ از این محیط با موفقیت استفاده شده است.

استفاده از DNA خطی نسبت به حلقوی باعث افزایش میزان ورود ترانس‌ژن داخل ژنوم میزبان می‌شود (۲) و به همین دلیل در این مطالعه از DNA خطی استفاده شد. نتایج PCR از مایع رویی آخرین مرحله شست‌وشو از دو گروه اسپرم‌هایی که تحت اثر هضم آنزیمی با *DNase* I قرار گرفتند و یا نگرفتند، به ترتیب منفی و مثبت بود که نشان داد آنزیم *DNase* I توانسته به طور کامل ترانس‌ژن‌های آزاد موجود در محیط را حذف کند. استفاده از هضم آنزیمی توسط *DNase* I باعث حذف ترانسژن‌هایی شد که به سطح اسپرم‌ها متصل بودند، ولی نتوانستند وارد اسپرم شوند. به همین دلیل باند مشاهده شده از این گروه نسبت به گروهی که تحت اثر هضم آنزیمی قرار نگرفتند، ضعیف‌تر بوده‌است. الدرسون و همکارانش (۲۴) با استفاده ازانکوباسیون یک میکروگرم DNA و لیپوفکتامین نشان دادند که ۳۰ درصد از اسپرم‌ها ترانس فکت شدند. آنها پس از دو بار شست‌وشوی اسپرم در دور ۲۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه فرض کردند که تمامی ترانس‌ژن‌های آزاد از محیط حذف شدند. در حالی که این تحقیق نشان داد که شست‌وشوی اسپرم در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه برای سه بار متوالی نمی‌تواند تمامی ترانس‌ژن‌ها را از محیط حذف کند. در مطالعات دیگری برای تفکیک بین ترانس‌ژن‌های متصل شده به سطح اسپرم و ترانس‌ژن‌های وارد شده به داخل اسپرم از هضم آنزیمی استفاده کردند (۲۹، ۳۰) که نتایج تحقیق حاضر نیز با نتایج آنها مطابقت دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد که اسپرم‌ها را می‌توان با انکوباسیون با DNA ترانسفکت کرد و به دلیل داشتن تحرک مناسب امکان استفاده از آنها برای لقاح آزمایشگاهی و یا حتی تلقیح مصنوعی وجود دارد. این روش به علت سادگی مراحل انجام کار، بازدهی نسبتا بالا و میزان موزاییک کم، در سال‌های گذشته با استقبال زیادی مواجه شده است و از آن برای ایجاد موش (۱۰، ۲۰)، خوک (۱۸، ۱۹)، گاو (۲۸، ۲۹)، خرگوش (۳۰) و میمون (۳۱) استفاده شده است.

تاکنون ژن‌های مختلفی از این طریق به جنین حیوانات منتقل شده است که اکثر این مطالعات برروی موش و خوک بوده است. علاوه بر انتقال ژن‌های مارکری EBFP، EGFP و DsRed2 به خوک (۱۹)، ژن hDAF نیز به خوک منتقل و بیان آن نیز مشاهده شده است (۳۶). نتیجه یک مطالعه اولیه توسط نویسندگان این مقاله با استفاده از اسپرم‌های ترانسفکت شده با روش انکوباسیون اسپرم با DNA خطی‌شده در حضور لیپوزوم‌ها (Lipofectamine2000) و انجام لقاح آزمایشگاهی و نیز تزریق درون سیتوپلاسمی تخمک، توانایی این تکنیک در ایجاد حیوانات ترانس‌ژنیک را نشان داد و جنین‌های ایجاد شده در زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت نور سبز ایجاد کردند (۳۷). هم اکنون آزمایش‌های دیگری جهت افزایش بازدهی این تکنیک در حال انجام است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که علی‌رغم حذف BSA از محیط SP-TALP درصد تحرک اسپرم‌ها در زمان انکوباسیون اسپرم و ترانس‌ژن به میزان بسیار اندکی تحت تاثیر قرار می‌گیرد و پس از انکوباسیون، شست‌وشوی اسپرم‌ها با محیط استاندارد SP-TALP باعث برگرداندن تحرک اسپرم‌ها به حالت نرمال می‌شود و درصد اسپرم‌های متحرک در این مرحله نسبت به سایر محیط‌های مورد استفاده در این آزمایش زیادتر است. اسپرم گاوهای هلشتاین ایرانی توانایی جذب ترانس‌ژن‌ها را دارند و می‌توان از آنها به عنوان ناقل ترانس ژن به تخمک گاو استفاده کرد.

برای افزایش بازدهی ترانس‌فکشن اسپرم‌ها می‌توان از تکنیک‌های لیپوفکشن و یا الکتروپوریشن استفاده کرد. هرچندکه این روش‌ها ممکن است باعث کاهش تحرک اسپرم شوند، ولی می‌توان اسپرم های ترانس فکت شده را در تزریق به داخل سیتوپلاسم تخمک استفاده کرد (۳۷).

تشکر و قدردانی

از کلیه کارکنان پژوهشکده رویان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، جهت فراهم آوردن تمامی امکانات برای انجام این تحقیق نهایت تشکر به عمل می‌آید. ضمنا تمامی هزینه‌های انجام این پژوهش توسط پژوهشکده رویان پرداخت شده است.

References

1. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. PNAS. 1980; 77(12): 7380-7384.
2. Wall RJ. Pronuclear microinjection. Cloning Stem Cells. 2002; 3(4): 209-220.
3. Wall RJ. New gene transfer methods. Theriogenology. 2002; 57(2): 289-202.
4. Chan AW, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel RD. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. PNAS. 1998; 95(24): 24028-24033.
5. Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science. 2002; 292(5502): 309-322.
5. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science. 2002; 295(5556): 868-872.
6. Gandolfi F. Sperm-mediated transgenesis. Theriogenology. 2000; 53(2): 227-237.
7. Smith KR. Sperm cell mediated transgenesis: Anim

Archive of SID

www.SID.ir

Biotechnol. 2999; 20(22): 2-23.
8. Brackett BG, Baranska W, Sawichi W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. PNAS USA. 1972; 68: 353-357.
9. 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): 727-723.
10. Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. Cell. 1989; 59(2): 239-242.
11. Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for marking transgenic mice. Cell. 1989; 59(2): 239-242
12. Birnstiel ML, Busslinger M. Dangerous liaisons -Spermatozoa as natural vectors for foreign DNA. Cell. 1989; 57(5): 702-702.
13. Chen TM, Chen YH. Transgenic sperm or deadly missiles? Fertil Steril. 1996; 66(1): 167-169.
14. Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. Experimental Cellular Research. 1995; 227(2): 57.
15. Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. Mol Reprod Dev. 1992; 31(3): 262-269.
16. Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, et al. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. Experimental Cellular Research. 1997; 233(2): 56-62.
17. Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Stefano CD, Varzi V, Wang H, et al. Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Mol Reprod Dev. 2003; 64(3): 284-292.
18. Kim JH, Jung-Ha HS, Lee HT, Chung KS. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. Mol Reprod Dev. 1997; 46(5): 525-526.
19. Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. Mol Reprod Dev. 2005; 72(1): 68-76.
20. Osada T, Toyoda A, Moisyadi S, Akutsu H, Hattori M, Sakaki Y, et al. Production of inbred and hybrid transgenic mice carrying large (>200 kb) foreign DNA fragments by intracytoplasmic sperm injection. Mol Reprod Dev. 2005; 72(3): 329-335.
21. Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A. Sperm-mediated gene transfer. Reprod Fertil Dev. 2006; 28(2): 29-23.
22. Camaioni A, Russo MA, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa-specific localization of DNA on sperm heads. J Reprod Fertil. 1992; 96(2): 203-222.
23. Anzar M, Buhr MM. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. Theriogenol. 2006; 65(4): 683-690.
24. Alderson J, Wilson B, Laible G, Pfeffer P, Huillier PL. Protamine sulphate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. Anim Reprod Sci. 2006; 91(2): 23-30.
25. Szczygiel MA, Moisyadi S, Ward WS. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. Biol Reprod. 2003; 68(5): 2903-2920.
26. Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Bracket BG, Tesfaye D, Jennen D, et al. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect of transfection reagent and DNA architecture. Theriogenology. 2007; 67(6): 2097-2207.
27. Rottmann OJ, Antes R, Hofer P, Maierhofer G. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. J Anim Breed Genet. 1992; 209: 64-70.
28. Shemsh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y. Gene integration into bovine sperm genome and its Expression in transgenic offspring. Mol Reprod Dev. 2000; 56(2): 306-308.
29. Rieth, A, Pothier F, Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. Mol Reprod Dev. 2000; 57(4): 338-345.
30. Wang, HJ, Lin AX, Chen YF. Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. Anim Biotechnol. 2003; 24(2): 255-265.
31. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, et al. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. Mol Hum Reprod. 2000; 6(1): 26-33.
32. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Laboratory Press; 2001.
33. Parrish JJ, Parrish S, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod.1988; 38(5): 2272-2280.
34. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2003; 33(2): 95-103.
35. Williams AC, Ford WCL. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. J Androl. 2002; 22(4): 680-695.
36. Lazzereschi D, Forni M, Cappello F, Bacci ML, Di Stefano C, Marfé G, et al. Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: Generation of hDAF transgenic pigs. Transplant Proc. 2000; 32(5): 892-894.
37. Eghbalsaied SH, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH, Hosseini M, Tanhayii S, Moolavi F, et al. Lipofection of bovine spermatozoa to carry EGFP transgene into oocytes. Arch Iran Med. 2007; 10(4): S171.

Archive of SID

www.SID.ir