Archive of SID

تولید بز تراریخته حامل ژن بیان کننده فاکتورIX انعقادی خون انسان با قابلیت ترشح در شیر به وسیله تکنیک انتقال هسته

اعظم دالمن[۲]، امیر امیری یکتا[۱]، محمد حسین صنعتی[۱و۳]، پوپک افتخاری یزدی[۲]، عبدالحسین شاهوردی[۲]، محمد تقی دانش زاده[۴]، مهدی وجگانی[۵]، علیرضا زمردی پور[۱و۳]، رحمان فاخری[۲]، حامد وزیری نسب[۱]، نیر السادات فاطمی[۱]، زینب وهابی[۲]، نجمه السادات مسعودی[۱]، مجتبی رضا زاده ولوجردی*[۲] و حمید گورابی*[۱]

[۱] تهران، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک

[۲] تهران، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی

[۳] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک

[۴] تهران، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه حیوانات آزمایشگاهی

[۵] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱

چکیده

تعداد بی شماری از پروتئین های نوترکیب وجود دارند که در شیر بیان می شوند. در این راستا می توان ژن مورد نظر را به منظور بیان در شیر یک حیوان مزرعه ای تحت کنترل عناصر تنظیمی قرار داد. انتقال هسته با استفاده از سلولهای ترانسفکت شده، ابزار کارآیی برای تولید حیوانات تراریخته است. در این مطالعه به منظور تولید بز تراریخته با توانایی ترشح فاکتور IX انعقادی انسانی نوترکیب (rhcfIX) در شیر، سازه ژنی(pBC1-hfIX) با قرارگیری cDNA ژن مذکور بعد از پروموتور بتا- کازئین ساخته شد. سپس سلولهای فیبروبلاست جنینی بز توسط pBC1-hfIX ترانسفکت شدند. سلولهای فیبروبلاست از جنینهای ۳۵ تا ۴۰ روزه بز تهیه گردید. سپس کلونهای مثبت (سلولهای فیبروبلاست حاوی سازه ژنی) انتخاب شده و توسط PCR تأیید شدند. به سلولهای فیبروبلاست جنینی ترانسفکت شده اجازه داده شد که پس از رسیدن به مرحله تراکم سلولی، به مدت ۷۲ ساعت در همان محیط DMEM حاوی ۱۵ در صد سرم کشت شده تا در مرحله G0/G1 سیکل سلولی هم زمان شوند. تخمکهای نابالغ از تخمدان های کشتارگاهی به دست آمدند و قبل از بی هسته سازی و انتقال هسته بالغ شدند. تخمکهای بازسازی شده با سلولهای دهنده، فیوژشده و فعال سازی آنها با استفاده از یونومایسین و 6DMAP انجام شد. جنینهای بازسازی شده به پذیرنده های هم زمان شده منتقل شدند. ۶۴ جنین حاصل از سلولهای فیبروبلاست جنینی ترانسفکت شده به ۱۲پذیرنده انتقال یافتند. در دو مورد از پذیرنده ها (۱۶.۶ درصد) بارداری در روز ۴۲ توسط سونوگرافی تأیید شد. یکی از بارداریها منجر به تولد دو بزغاله سالم گردید. حضور ژن فاکتور IX انعقادی انسانی در بزغاله ها با استفاده از واکنش PCR وsequencing تأیید گردید. این نتایج نشان می دهد که سلولهای فیبروبلاست جنینی بز حاوی ژن فاکتور IX می توانند تکوین طبیعی جنین را پس از انتقال هسته تا مرحله ترم پیش برند. این اولین تولد زنده حیوان تراریخته در ایران است.

واژه های کلیدی: فاکتورIX انعقادی، بز، تراریخته، انتقال هسته سلول سوماتیک، فیبروبلاست.

+نویسندگان اول

*نویسندگان مسئول: تلفن تماس: ۲۲۳۳۹۹۴۷، پست الکترونیکی: gourabi@royaninstitute.org و r_valojerdi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حیوانات تراریخته ابزار مناسبی برای تولید پروتئینهای نوترکیب دارویی هستند که قادرند محصولات با کیفیت بالا و هزینه پایین تولید نمایند (۹ و ۲۵). بزهای تراریخته برای تولید پروتئینهای دارویی در شیر، به دلیل داشتن دوره های بارداری کوتاه تر، بلوغ جنسی زودتر و اندازه کوچکتر نسبت به گاو مناسب تر هستند (۱ و ۸) بنابراین به منظور شبیه سازی از طریق انتقال هسته، استفاده از این حیوانات ترجیح داده می شوند (۳ و ۱۴). انواع پروتئینهای نوترکیب انسانی نظیر آنتی ترومبین (۱۸)، لیزوزوم (۲۲)، بوتریل کولین استراز (۱۰) و لاکتوفرین (۳۱) با موفقیت توسط غدد پستانی بیان شده و در شیر بزهای تراریخته ترشح شده اند.

انتقال هسته با استفاده از سلولهای دهنده (SCNT; Somatic Cell Nuclear Transfer) روش کارآ و جایگزینی را برای تولید حیوانات تراریخته بیان کننده پروتئین مورد نظر فراهم می کنند (۲). در این روش پس از انتخاب نوع سلول دهنده، سلول را با ترانس ژن مورد نظر ترکیب کرده و می توان حضور ترانس ژن را قبل از انتقال هسته تأیید نمود (۱۹)، اگر چه گزارشهایی از تولد فرزندان زنده تراریخته توسط انتقال هسته سلول سوماتیک وجود دارد ولی کارآیی کلونینگ هنوز رضایت بخش نیست (۱۱ و ۳۰).

نتایج قبلی، اهمیت ارزیابی بیان اختصاصی ترانس ژن را در بافت هدف نشان می دهند. از این گذشته نسبت بالایی از فرزندان به دست آمده از SCNT، زمانی که از سلولهای ترانسفکت شده-مناسب جهت انتقال هسته استفاده گردید، تراریخته بودند (۴، ۲۶ و ۳۲). به دلیل درج تصادفی ژن خارجی، سلولهای منفردی که به صورت صحیح و موفق درج و ترانسفکت شده اند انتخاب گردیده تا تولید قابل قبولی از جنین تراریخته وجود داشته باشد (۲۴). گزارشهای کمی از روشهای ارزیابی بیان ترانس ژن در بافت هدف در آزمایشگاه و آماده کردن کلونهای مناسب سلولهای ترانس ژن برای SCNT وجود دارد (۳۲).

نقص در سنتز فاکتور IX موجب بیماری هموفیلی B یا کریسمس می شود (۵). این بیماری یک اختلال وابسته به x است که در یک مورد از ۳۰ هزار مرد اتفاق می افتد. بیمارانی که هموفیلی B دارند با فاکتور IX که از پلاسمای ذخیره شدهٔ افراد طبیعی به دست می آید درمان می شوند. این آماده سازی فاکتور IX ممکن است تب آور باشد یا با عوامل پاتولوژیک یا ویروسی آلوده شود، بنابراین نیاز است که وسیله ای برای آماده سازی فاکتور IX خالص که نیاز به استخراج از پلاسمای انسان نداشته باشد فراهم گردد. از این رو تولید انبوه این محصول به وسیله یک کارخانه طبیعی مانند غدد شیری حیوانات مورد توجه قرار گرفت.

هدف از این مطالعه، تولید بز تراریخته با توانایی ترشح فاکتور IX انعقادی انسانی نوترکیب (rhcfIX) در شیر توسط روش SCNT است. این مطالعه شامل ارزیابی حضور ژن فاکتور IX انعقادی انسانی در سلولهای دهنده در آزمایشگاه، آماده سازی سلولهای فیبروبلاست جنینی ترانسفکت شده برای NT و بررسی و تأیید حضور ژن فاکتور IX انعقادی انسانی در بزغاله های متولد شده مشتق از این سلولهای ترانسفکت شده می باشد.

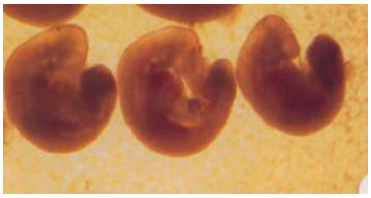
مواد و روشها

تهیه سلول فیبروبلاست جنینی به منظور انتقال به تخمک بدون هسته: جنین ۳۵ روزه بز نژاد نجدی جهت تهیه سلولهای فیبروبلاست جنینی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). با کمک یک پنس استریل و اسکالپل (تیغ کوچک)، سر ، قلب و کبد جنینها جدا گردید. باقیمانده جنینها در پتری دیش متوسط حاوی مقداری محیط DMEM (Gibco, USA) ریخته شده و چندین بار از سر سرنگ نمره ۱۸ عبور داده شدند تا در حد امکان به قطعات

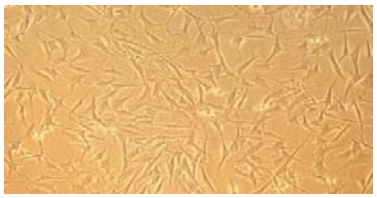
www.SID.ir

Archive of SID

کوچک تبدیل شوند. قطعات خرد شده بر روی سطح فلاسک کشت یا پتری دیش در مقادیر کم محیط DMEM با غلظت بالای سرم (۱۵ در صد FBS (Hyclone, USA)) کشت داده شدند. سپس سلولها جهت تکثیر در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵ در صد CO_2 قرار داده شدند (شکل ۲). محیط کشت سلولها هر ۳ روز یکبار تعویض گردید. پس از تکثیر، از سلولها جهت تعیین جنسیت کاریوتایپ گرفته شد. جنینهای با جنسیت ماده جهت انتقال هسته مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱- جنین ۳۵ روزه بز



شکل ۲- سلولهای فیبروبلاست جنینی بز

تهیه سازه ژنی: mRNA فاکتور ۹ انعقادی خون انسان از سلولهای کبدی استخراج گردید و cDNA کد کننده آن با استفاده از روش استاندارد RT/PCR ساخته شد. جایگاه برش *XhoI در انتهای ۵* پرایمر مورد نیاز تعبیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرهای به کار رفته جهت تکثیر cDNA فاکتور IX انعقادی خون انسان

نام پرایمر	توالی پرایمر('۳→'۵)	طول قطعه
For FIX-1	CTCGAGCCACCATGCAGCGCGTGAACATGATC	۱۳۸۶ bp
Rev FIX-1	CTCGAGTCATTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTA	
For FIX-3	GCAGAAAACCAGAAGTCCTGTG	۵۳۷ bp
Rev FIX-3	CGTGTATTCCTTGTCAGCAATG	

واکنش PCR شامل ۳۰ سیکل با دمای الحاق ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت تکثیر ژن مورد نظر انجام شد.

محصول PCR با طول ۱۳۸۶ جفت باز درون وکتور pTZ57R/T کلون و با استفاده از تکنیکهای colony PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی تأیید گردید. پس از تعیین توالی مشخص شد که دو جهش در ژن فاکتور ۹ ایجاد شده است، درنتیجه به منظور تصحیح جهشهای ایجاد شده از روش Soeing PCR استفاده گردید و پرایمرهایی نیز در همین راستا طراحی شدند (جدول ۲، شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- آغازگرهای های به کار رفته جهت تصحیح جهش

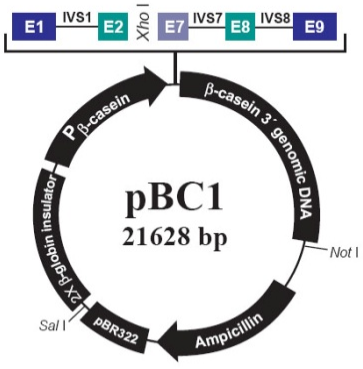
نام پرایمر	توالی پرایمر(۳'→۵')
For Mut-1 FIX	AGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAA
Rev Mut-1 FIX	TTCTCGTGCTTCTTCAAAACTACACT
For Mut-2 FIX	GTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTG
Rev Mut-2 FIX	CACCTGCGACAACTGTAATTTTAAC

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTTAGGATAT
CTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCA
AAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGA
AGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTT
GGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGG
ATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGT
AACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGG
TTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCAT
TTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATC
ATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGT
TGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACT
GCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAG
ACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCAGCT
ATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTAC
GTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATG
TAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTC
CACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGC
TGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGT
GGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAAT
ATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTAA

شکل ۳- توالی نوکلئوتیدی فاکتور IX انعقادی خون انسان، نوکلئوتیدهای اصلاح شده با روش Soeing PCR به صورت برجسته نمایش داده شده اند

بعد از اصلاح جهشهای به وجود آمده، مجدداً عملیات کلون سازی درون وکتور pTZ57R/T انجام شده و تمام مراحل تأییدی که در بالا ذکر شد، به کار رفتند. پس از اطمینان از صحت توالی ژن فاکتور ۹، ژن مذکور طی یک واکنش هضم آنزیمی به وسیله آنزیم برشی *XhoI* از وکتور نوترکیب خارج گردید.

قطعه ژن خارج شده از T وکتور با استفاده از واکنش لیگاسیون درون وکتور pBC1 که از قبل با کمک آنزیم *XhoI* به صورت خطی در آمده بود قرار گرفت(شکل ۴).

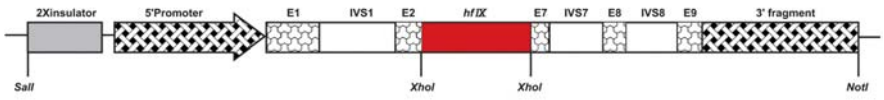


شکل ۴- وکتور pBC1 با حاوی پروموتر بتا کازئین

www.SID.ir

Archive of SID

لازم به ذکر است که ژن فاکتور ۹ درون وکتور بیانی در پایین دست پروموتر بتا کازئین گذاشته شد. پس از انتقال وکتور بیانی نوترکیب (hfIX-pBC1) به سیستم باکتریایی، آزمایشهای تأیید کننده کلونینگ شامل colony PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی نیز در این مرحله انجام شد. در ادامه، به منظور درج کردن سازه ژنی درون ژنوم بز، وکتور hfIX-pBC1 از باکتری استخراج گردید و با استفاده از آنزیمهای برشی *SalI* و *NotI* ژن مقاومت به آمپی سیلین حذف شد و سازه ژنی به صورت خطی در آمد (شکل ۵).



شکل ۵- سازه ژنی خطی شده به وسیله آنزیمهای برشی *SalI* و *NotI*

وارد کردن سازه ژنی به درون هسته سلولهای فیبروبلاست جنینی با استفاده از روش الکتروپوریشن: حدود 10^7سلول فیبروبلاست جنینی بز در ۴۲۵ میکرولیتر DPBS به صورت سوسپانسیون در آمد. در ادامه محلول ۲۵ میکرولیتری سازه ژنی با غلظت ۴۰ میکروگرم DNA به کووت ۰.۴ سانتیمتری (Bio-Rad) اضافه شد. در ادامه با کمک توسط دستگاه الکتروپوریشن یا Gene Pulser (Bio-Rad München, Germany)به هر کووت ۲۱۸ ولت پالس الکتریکی داده شد. در ادامه محتویات هر کووت در محیط DMEM حاوی ۱۰ FBS درصد حل شده و در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعد سلولهای ترانسفکت شده در پتری دیشهای ۱۰ سانتیمتری کشت ~~داده~~ شده و پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت آنها تعویض گردید. محیط کشت اولیه جهت بررسی به وسیله واکنش PCR، نگهداری شد.

شناسایی سلولهای ترانسفکت شده : بعد از ۳ تا ۵ روز، تعداد کمی از سلولها جهت آنالیز به وسیله واکنش PCR، جداسازی و مابقی فریز شدند. DNA ژنومیک با استفاده از روش استاندارد فنل/کلروفرم استخراج گردید و واکنش PCR با استفاده از پرایمرهایی که قابلیت شناسایی cDNA کد کننده فاکتور ۹ انعقادی خون انسان را درون DNA ژنومیک سلولهای فیبروبلاست جنینی بز داشتند، بر روی سلولها و محیط کشت آنها انجام شد. انجام واکنش PCR روی محیط کشت به منظور جلوگیری از به وجود آمدن نتایج مثبت کاذب صورت پذیرفت. سلولهای ترانس فکت شده ذوب گردیده و در پلیتهای شش خانه در غلظت $10^4\times$ ۱.۳ به ازای هر خانه (رقت ۱:۱۰) کشت داده شدند. بعد از ۶ روز نیمی از سلولهای هر خانه جهت افزایش جمعیت سلولی پاساژ داده شدند و نیمی دیگر برای آنالیز مولکولی (FISH and Single Cell PCR) مورد استفاده قرار گرفتند.

هیبریداسیون درجای فلورسنس: پلاسمید نوترکیب (hfIX-pBC1) استخراج شده به وسیله کیت (high pure plasmid isolation kit,Roche)، بااستفاده از روش nick translation (Vysis DNA labelling kit,,Abboott Molecular) و Spectrum Orange-dUTP (Vysis,abbott molecular) طبق دستورالعمل شرکت سازنده نشاندار گردید. لامهای متافازی مطابق با روش استاندارد، از کشتهای مثبت اعلام شده فیبروبلاستهای جنینی آماده شدند. واکنش هیبریداسیون با استفاده از روش Vysis (Abott molecular) صورت پذیرفت. پس از انجام تأییدهای مولکولی لازم روی سلولهای ترانسفکت شده، از

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه های سلولی دارای ترانس ژن جهت انتقال هسته استفاده شد.

هم زمان سازی چرخه سلولی سلول دهنده با تخمک بالغ: از مهمترین مراحل عملی در طی روند شبیه سازی که به طور وسیعی بر کیفیت و بازدهی روند انتقال هسته اثر گذار است، تنظیم دقیق سیکل سلولی با توجه به سیکل سلولی تخمک می باشد. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیقات متعدد، سیکل مناسب سلولی مرحله G0/G1 است. برای رسیدن به این سلولها چندین روش وجود دارد . در این طرح روش تراکم کامل سلولی جهت هم زمان سازی که در عین حال آپوپتوز کمتری را به همراه داشته باشد مورد آزمایش قرار گرفت. پس از رسیدن سلولها به ۹۰ درصد تراکم ، سلولها در محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس این سلولها تریپسینه شده و برای آنالیز سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری آماده شدند. فیبروبلاستهای در حال تقسیم با ۷۰-۶۰ درصد تراکم به عنوان گروه کنترل به کار برده شد.

تعیین سیکل سلولی با فلوسایتومتری: به منظور تعیین مراحل مختلف سیکل سلولی، محتوای DNA با استفاده از PI (Propidium Iodide) رنگ آمیزی شد و آنالیز فلوسایتومتری توسط دستگاه فلوسایتومتر کالیبور FACS (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) انجام گرفت. فیبروبلاستهای کشت شده با استفاده از تریپسین-EDTA جدا شدند و در DMEM با غلظت 1×10^{6}cells/ml دوباره مخلوط شدند. بعد از سانتریفوژ در ۱۲۰۰rpm برای ۵ دقیقه، ۳ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد با دمای۴ درجه سانتی گراد به آهستگی به سلولها اضافه شد. برای جلوگیری از به هم چسبیدن سلولها، این مرحله بر روی شیکر انجام گرفت. پس از ۲۰ دقیقه فیکساسیون، سلولها با PBS شسته شدند. سپس در تریتون 100-x ۰/۱ درصد در درجه حرارت اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. در ادامه سلولها با مخلوطی از ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر PI (Propidium Iodid, Sigma)، و ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیترA RNase (Sigma) در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت رنگ آمیزی و در میزان ۲۰۰-۵۰۰cells/s آنالیز شدند. برای جداسازی مراحل G0 و G1 سیکل سلولی از رنگ آمیزی دو تایی PI و FITC(Fluorescein isothiocyanate, sigma) استفاده شد. در این آزمایش سلولها به مدت نیم ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد با ۰/۰۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر FITC ، ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر PI ، و ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر RNase A رنگ آمیزی شدند. با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، ۱۰۰۰۰ سلول برای هر نمونه ضبط شد. درصد سلولها در فازهای مختلف سیکل سلولی با استفاده از نرم افزار Win MDI version 2.9 محاسبه گردید.

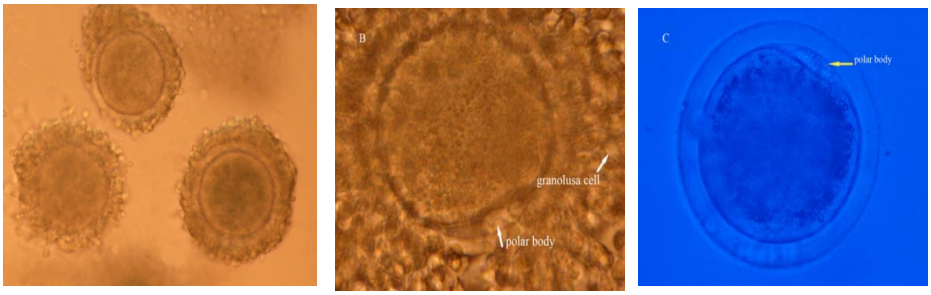
تهیه تخمک گیرنده هسته : تخمدانهایی که از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شده بودند بررسی شده و ۱۰۵۷ تخمدان برای آسپیره کردن انتخاب گردیدند. معمولاً تخمدانهایی را که قطر فولیکولهای آنها ۸- ۲ میلی لیتر باشد برای آسپیره انتخاب می‌شوند. عمل آسپیره کردن با سرنگ و سر سوزن درجه ۱۹ محتوی محیط کشت مناسب (M199 حاوی ۲۵ میلی مولارHEPES)(Gibco, USA) انجام گرفت. سپس در زیر استریو میکروسکوپ، ۱۶۷۸ تخمک دارای حداقل ۳ لایه سلول گرانولوزا جمع‌آوری شده و پس از شستشو در محیط کشت TCM بدون HEPES به قطره‌های ۳۰ میکرولیتری محیط IVM زیر روغن منتقل گردید. این قطره‌ها حاوی محیط کشت TCM بدون HEPES(Gibco, USA) همراه با ۱۰ درصد Goat Serum، سیستئامین ۱۰۰ میکرومولار (Fluka, Switzerland)، یک میکروگرم در میلی لیتر استرادیول (Sigma, Germany) و ۰/۰۲ واحد بر میلی لیتر FSH(Sioux) و ۰/۰۲ واحد بر میلی لیتر LH (Sioux) است. سپس تخمکهای کشت شده تحت شرایط فوق به انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتی گراد و میزان ۵

www.SID.ir

Archive of SID

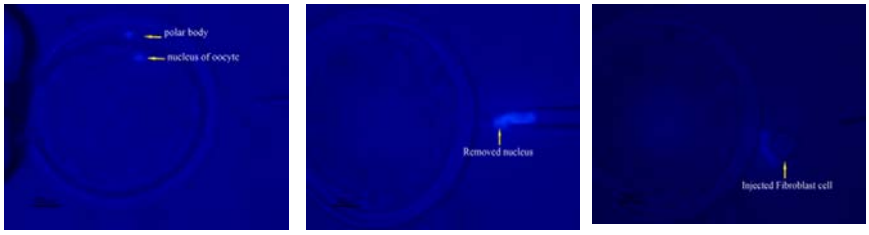
درصد Co_2 و۹۰ درصد N_2 به مدت ۲۴ ساعت منتقل گردید.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک: به دنبال بلوغ آزمایشگاهی پس از ۲۴- ۱۸ساعت، سلولهای کومولوس اطراف تخمک توسط آنزیم هیالورونیداز (۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) (Sigma, Germany) و ورتکس کردن از اطراف تخمک جدا شده و پس از بررسی وجود اولین جسم قطبی (پولار بادی) در زیر استریومیکروسکوپ به عنوان نشانگر انجام اولین تقسیم میوز، ۱۱۵۲ تخمک بالغ شده جمع آوری گردید (شکل ۶).



شکل۶- **A ;** تخمک نابالغ بز، **B ;** تخمک بالغ شده بز پس از ۲۴ ساعت همراه با سلولهای گرانولوزا، **C ;** تخمک بالغ که توسط آنزیم هیالورونیداز سلولهای کومولوس اطراف آنها برداشته شده است.

بی هسته سازی تخمک و انتقال سلول دهنده به فضای زیر پرده شفاف تخمک بی هسته: پس از حذف سلولهای گرانولوزا، تخمکهای بالغ انتخاب شده و در محیط کشت Emcare (ICP bio, Newzealand) حاوی یک در صد سرم بز قرار گرفتند. عمل بی‌هسته سازی به وسیله دستگاه میکرومانیپولاتور انجام شد. در این مرحله با استفاده از پیپت شیشه ای کاملاً نازک با لبه تیز و برنده به درون پرده شفاف و سیتوپلاسم نفوذ کرده و محتویات هسته همراه با مقدار بسیار کمی سیتوپلاسم خارج شد. سپس سلول فیبروبلاست به صورت کاملاً سالم به درون فضای زیر پرده شفاف تخمک وارد شد (شکل ۷). تخمکهای باز سازی شده در محیط M199 بدون HEPES حاوی ۱۰ در صد سرم بز به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.



شکل۷- بی هسته سازی تخمک بالغ و انتقال سلول فیبروبلاست جنینی بز به درون تخمک بی هسته

الحاق سلول دهنده به تخمک بی هسته: از آنجایی که سلول دهنده در فضای زیر پرده شفاف قرار می گیرد لازم است که جهت ادغام هسته درون سیتوپلاسم گیرنده، از روش فیوژن استفاده شود. بهترین و رایج ترین روش

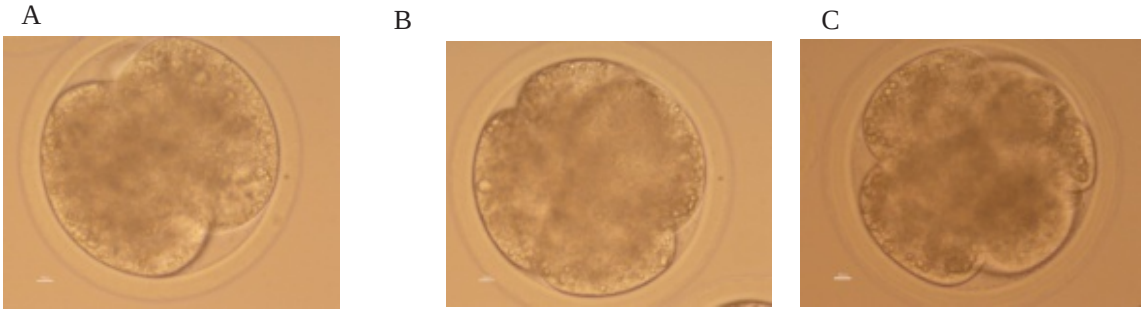
www.SID.ir

Archive of SID

فیوژن استفاده از پالس الکتریکی است. با استفاده از الکترودهای لام فیوژن که به دستگاه BTX (electro cell manipulator) متصل است تخمکهای باز سازی شده در جهت مناسب قرار داده شدند. پالس الکتریکی ۲/۳۹kv/cm در ۱۵ میکروثانیه در کمترین فاصله ممکن به مجموعه تخمک–سلول دهنده القاء شد.

فعال سازی تخمک بازسازی شده: تخمکهای بازسازی شده یک ساعت پس از الحاق در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. تخمکهای الحاق شده برای فعال سازی مصنوعی به محیط کشت Global (Lifeglobal) حاوی ۱۰ در صد سرم بز و یونومایسین ۵ میکرومولار (Sigma, Germany) به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق منتقل گردیدند. سپس جنینهای بازسازی شده در محیط کشت Global حاوی ۱۰ درصد سرم بز و 6DMAP ۲ میلی مولار (Sigma, Germany) به مدت ۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.

کشت جنین تراریخته : جنینها پس از فعال سازی به محیط کشت Global حاوی ۱۰ درصد سرم منتقل شده و تا مرحله ۸–۴ سلولی در آزمایشگاه کشت داده شدند(شکل ۸).



شکل ۸– مراحل مختلف تکوین جنین بز تراریخته. A، جنین مرحله دو سلولی B ، جنین مرحله چهار سلولی C، جنین مرحله ۸ سلولی.

آماده سازی رحم مادر جایگزین : برای همزمان سازی ابتدا یک منبع حاوی هورمون جنسی پروژسترون در واژن یا مهبل دام به مدت ۷ روز قرار داده شد که با آزاد سازی تدریجی این هورمون و جذب آن از دیواره مهبل اثر خود را مبنی بر کنترل چرخه تولید مثلی دام ماده القاء نمود. ۶ شش روز پس از جاگذاری منبع پروژسترون، هورمون گنادوتروپین اسبی به حیوان تزریق شد که موجب تشکیل فولیکولهای حاوی سلول نارس جنسی ماده در سطح تخمدانها گردید. در روز هفتم آماده سازی، هم زمان با خروج منبع پروژسترون، از پروستاگلاندین استفاده شد و در روز نهم هورمون گنادوتروپین انسانی به بز تزریق شد که باعث آزاد سازی تخمکهای شکل گرفته در فولیکولهای سطح تخمدان گردید.

انتقال جنینهای تراریخته: به دلیل استفاده از جنینهای ۴ تا ۸ سلولی، انتقال جنین ۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین انسانی صورت گرفت، زیرا در این مرحله جسم یا اجسام زردی بر روی تخمدانها شکل گرفته اند که حداقل ۴۸ ساعت از شکل گیری آنها گذشته است و قادرند جنینهای با سن ۲ تا ۳ روزه را در روند رشد در دستگاه داخلی ماده حمایت نمایند. عمل انتقال جنین با روش جراحی لاپاراتومی یا باز کردن شکم انجام شد. بعد از ورود به محوطه خلفی شکم، جنینها که قبلاً به درون لوله انتقال کشیده شده اند به لوله رحمی منتقل شدند. تعداد جنینها در هر انتقال ۴ تا ۶ عدد بود.

مراقبتهای حین بارداری: بعد از گذشت ۶ هفته از انتقال جنین، به منظور تایید حاملگی بزها سونوگرافی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

حضور ضربان قلب جنین به عنوان علامت بارداری در نظر گرفته می شود. بزهای باردار تحت مراقبت ویژه قرار گرفته و سونوگرافی هر ماه تکرار شد.

تأیید تراریختگی بزغاله های متولد شده: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن فاکتور ۹ انعقادی انسان، واکنش PCR روی DNA ژنومیک استخراج شده از خون بزغاله های متولد شده انجام شد (جدول ۱). در ادامه، محصولات واکنشهای PCR تعیین توالی گردیدند (Genetic analyzer 3130) تمام مراحل مذکور بر روی نمونه های کنترل مثبت (سازه ژنی) و کنترل منفی (DNA ژنومیک بزهای غیر ترانس ژن و فاقد الگو) گذاشته شد.

نتایج

آنالیز سیکل سلولی: به منظور ارزیابی تأثیر تراکم کامل سلولی بر سیکل سلولی، محتوای DNA توسط آنالیز FACS اندازه گیری شد و در صد نسبی سلولهای موجود در مراحل G0/G1 (محتوای 2C DNA)، S (2C-4C) و G2/M (محتوای 4C DNA) محاسبه شد. جدول ۳ درصد سلولهای در حال رشد را در فازهای مختلف سیکل سلولی نشان می دهد. زمانی که سلولها با PI و FITC رنگ آمیزی شدند محتوای DNA و پروتئین توسط FACS آنالیز شد. کشت سلولها تا تراکم و ۷۲ ساعت بعد از رسیدن به تراکم به ترتیب منجر به ورود ۸۰/۲۷ و ۹۱/۵۳ درصد سلولها به فاز G0/G1 شد که این گروهها نیز نسبت به گروه سلولهای در حال رشد تفاوت چشمگیری داشتند ($P<0.05$).

با استفاده از رنگ آمیزی دوتایی PI و FITC جمعیتهای سلولی فاز G0 و G1 از هم تفکیک شدند. میزان بیشتری از سلولهای تراکم کامل در فاز G1 سیکل سلولی قرار داشتند (۸۴/۲۹ درصد) (شکل ۹).

میزان کلیواژ حاصل از جنینهای تراریخت: در این آزمایش ۱۰۵۷ تخمدان آسپیره گردید و ۱۶۷۸ تخمک نابالغ از آنها جمع آوری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در محیط کشت بلوغ، ۱۱۵۲ تخمک به مرحله متافاز II رسیدند و بقیه در مرحله متافازI باقی ماندند. از این تعداد، ۶۴۹ تخمک متافاز II بی هسته شدند. ۴۴۵ تخمک باز سازی شده فعال سازی شدند. از این میزان طی ۷۲ ساعت ۲۳۱ جنین بازسازی شده (۵۲ درصد) بوجود آمد. ۶۴ جنین به بزهای پذیرنده همزمان شده انتقال یافت که از این تعداد دو مورد حاملگی توسط اولتراسونوگرافی تأیید شد. یکی از آنها در پایان ماه دوم سقط شد. و آزمایشهای مولکولی انجام شده بر روی جنین، تراریختگی آن را تأیید کرد. بارداری دوم منجر به تولد بزغاله های دوقلو گردید (جدول ۴ و۵).

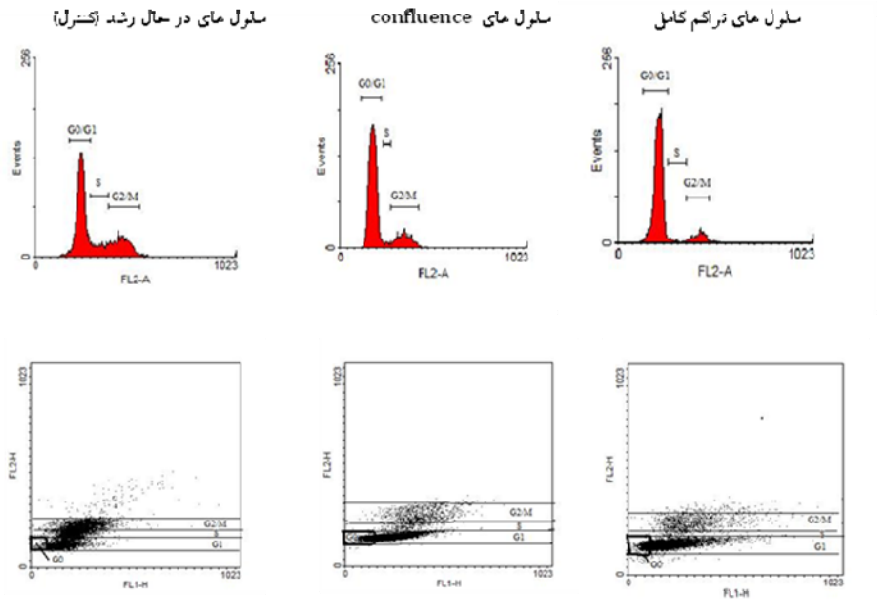
جدول ۳- توزیع (%,mean±SE) مراحل مختلف سیکل سلولی در سلولهای فیبروبلاست پس از تراکم کامل سلولی

مراحل مختلف سیکل سلولی	کنترل (سلولهای در حال رشد)	سلولهای confluence	سلولهای تراکم کامل
G0	۴/۵۶±۰/۴۲^{a}	۱۲/۷۹±۰/۹۹^{b,c}	۷/۲۴±۰/۴۳^{b,d,f,h}
G1	۵۱/۸۸±۲/۳۶^{a}	۶۷/۴۷±۱/۱۱^{b,c}	۸۴/۲۹±۱/۴۱^{b,d,f,h}
S	۱۹/۰۱±۰/۵۲^{a}	۲/۳۹±۰/۱۴^{b}	۱/۸۳±۰/۴۰^{b}
G2/M	۲۳/۳۸±۲/۵۵^{a}	۱۶/۰۴±۰/۲۴^{b,c}	۶/۳۹±۱/۱۷^{b,d}

در هر ردیف بین حروف a -b ،c – d ،e– f و g -h از نظر آماری تفاوت معنی دار وجود دارد ($P<0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹- توزیع مراحل مختلف سیکل سلولی توسط FACS.

جدول ۴- میزان تکوین ۷۲ ساعته جنینهای تراریخته مشتق از سلولهای فیبروبلاست جنینی.

تخمدان	تخمکهای جمع آوری شده	تخمکهای بالغ	تخمکهای بازسازی شده	تخمکهای فیوژ شده	تخمکهای فعال سازی شده	جنینهای بازسازی شده
۱۰۵۷	۱۶۷۸	۱۱۵۲ (٪۶۹)	۶۳۳	۶۰۱	۴۴۵ (٪۷۰)	۲۳۱(٪۵۲)

جدول ۵- میزان بارداری جنینهای تراریخته مشتق از سلولهای فیبروبلاست جنینی.

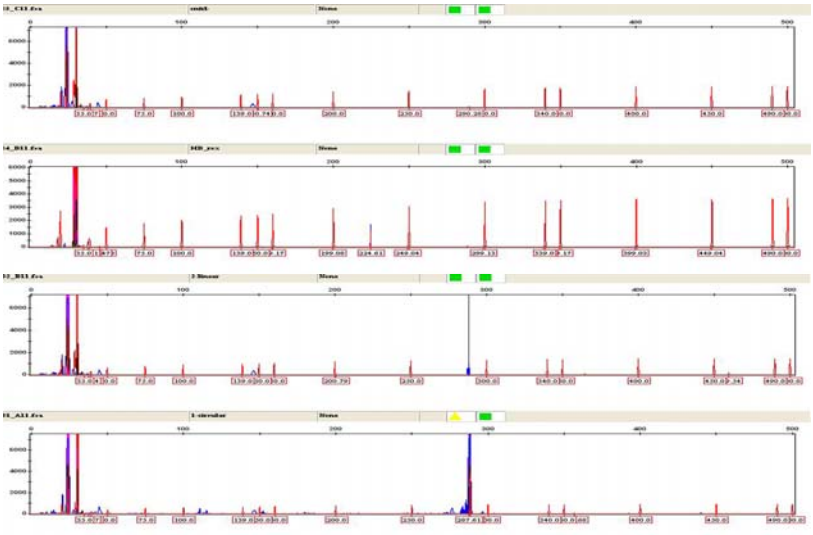
تخمک های فیوژ شده	جنین های بازسازی شده	جنین های انتقال یافته	تعداد پذیرنده ها	ماه اول بارداری (۳۰ روزگی)	تعداد فرزندان
۶۰۱	۲۱۳	۶۴	۱۲	۲	۲

تأیید مثبت بودن سلولهای ترانسفکت شده: دراین مرحله با استفاده از واکنش PCR جهت تأیید مقدماتی و در ادامه واکنش single cell PCR به منظور تأیید تکمیلی، ۱۲۰ پلیت کشت سلولهای ترانسفکت شده مورد آنالیز قرار گرفتند. از این بین تعداد ۳ پلیت مثبت گزارش گردید (شکل۱۰). در ادامه وقبل از استفاده از این سلولها برای

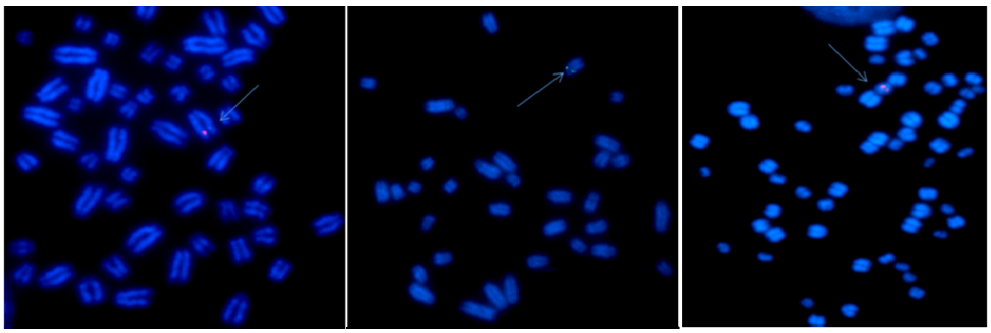
www.SID.ir

Archive of SID

انتقال هسته به تخمک حیوان انجام واکنش هیبریداسیون درجای فلورسنس (FISH) روی ۳ لاین گزارش شده تأیید دیگری بر مثبت بودن آنها بود (شکل ۱۱). پس ازحصول اطمینان از قرارگیری ترانس ژن درون ژنوم سلولهای فیبروبلاست، از لاینهای مثبت سلولی جهت انتقال هسته استفاده شد.



شکل ۱۰- آنالیز واکنش single cell PCR ، از بالا ردیف ۱و۲: کنترل منفی، ردیف ۳: نمونه سلول ترانسفکت شده و ردیف ۴: کنترل مثبت



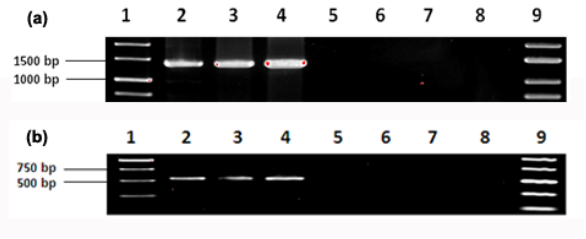
شکل ۱۱- واکنش هیبریداسیون درجای فلورسنس روی سلولهای متافازی کشت داده شده از لاینهای مثبت

بررسی حیوانات متولد شده ازلحاظ حضور ترانس ژن در آنها: پس از تولد حیوانات جهت تأیید تراریخته بودن آنها واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن فاکتور ۹ انعقادی انسان به دفعات انجام گردید (یک جفت پرایمر توالی کامل ژن فاکتور ۹ و جفت پرایمر دیگر درون قطعه اول را تکثیر می نمود) و به همراه آن نیز علاوه بر نمونه کنترل مثبت نمونه های کنترل منفی نیز شامل بزهای غیر ترانس ژن و فاقد الگو گذاشته شد (شکل ۱۲). بعد از مشاهده باند مربوط به قطعه ژن فاکتور ۹ بر روی ژل، جهت بررسی قطعی، محصولات واکنش های PCR تعیین توالی گردیدند . پس از آنالیز توالی خروجی از دستگاه

www.SID.ir

Archive of SID

sequencer در سایت NCBI، وجود ژن مذکور درون ژنوم بزغاله های متولد شده محرز گردید (شکل ۱۳).



شکل۱۲- نتایج واکنشPCR: ردیف های A,B ستون ۱: مارکر اندازه مولکولی، ستون ۲: بز تراریخته شماره یک، ستون ۳: بز تراریخته شماره دو، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون ۵، ۶ و ۷: کنترل منفی بز های نرمال، ستون ۸: کنترل منفی فاقد الگو، ستون ۹: مارکر اندازه مولکولی

شکل ۱۳- اولین بزغاله های **تراریخته** دارای ژن فاکتور ۹ انعقادی انسانی در ایران

بحث

تولید حیوانات تراریخته، که قادر به ترشح پروتئینهای نوترکیب با خاصیت دارویی در شیر خود هستند، از پتانسیل بالایی برخوردارند. هم اکنون معمول ترین روش به کار رفته برای تولید این قبیل حیوانات، انتقال سازه ژنی به سلولهای سوماتیک است که به عنوان دهنده های کاریوپلاست برای انتقال هسته به کار برده می شوند (۲۹). در روند تولید حیوانات تراریخته معمولاً از ژنهای انسانی استفاده می شود و در این تحقیق نیز از ژن فاکتور IX انعقادی انسان جهت انتقال به سلولهای سوماتیک بز به منظور ترشح در شیر حیوان با کمک پروموتور بتا کازئین استفاده گردید. در مطالعه حاضر ثابت گردید که سلولهای جنینی بز ترانسفکت شده با ژن فاکتور IX انعقادی انسان تکوین جنین را تا مرحله ترم حمایت می کند. دو بزغاله تراریخته توسط انتقال هسته سلول فیبروبلاست جنینی بز به تخمکهای بالغ شده آزمایشگاهی تولید شدند. هر دو بزغاله متولد شده در این مطالعه دارای وزن طبیعی هنگام تولد بودند. فیبروبلاست جنینی معمولاً سلولهای انتخابی برای تولید لاینهای ترانس ژن هستند که در این مطالعه سلولهای فیبروبلاست جنینی به عنوان منبع سلول دهنده انتخاب شدند تعداد زیادی از حیوانات اهلی کلون شده تراریخته به صورت موفق با استفاده از فیبروبلاست جنینی تولید شده اند (۱۹).

سیکل سلولی سلولهای دهنده همچنین فاکتور مهمی در تکوین جنینهای انتقال هسته است (۶ و ۲۹). تکوین موفق این جنینها تا مرحله ترم با استفاده از سلولهای دهنده موجود در فازG_0 (سلولهای حاصل از کاهش سرم) ویا مرحله G_1 (سلولهای حاصل از تراکم یا تراکم کامل سلولی) به دست می آید (۷، ۱۲، ۱۳ و ۲۸). سلولهای فیبروبلاست جنینی تراریخته با استفاده از روش تراکم کامل سلولی در مرحله G_1 هم زمان شدند. دو دلیل اصلی استفاده از سلولهای مرحله G_1 حضور سلولهای آپوپتوتیک کمتر در جمعیت این سلولها و احتمال همزمانی بهتر سیکل سلولی هسته G_1 و سیتوپلاسم تخمک است (۲۶). جهت انتقال سازه ژنی به سلولهای مذکور پس از مقایسه دو روش لیپوفکشن و الکتروپوریشن، در نهایت روش الکتروپوریشن به دلیل راندمان بالاتر و نحوه اجرای سریع تر انتخاب گردید. به منظور اطمینان قطعی از حضور ژن مورد نظر درون سلولها علاوه بر روشهای به کار رفته در تحقیقات مشابه، از روش single cell PCR و در ادامه هیبریداسیون درجای فلورسنس استفاده گردید که نتایج به

www.SID.ir

Archive of SID

دست آمده از هر دو روش مؤید یکدیگر بودند. انتقال هسته بر روی تخمکهای متوقف شده در مرحله متافاز II صورت گرفت. استفاده از تخمکهای مرحله متافاز II یا تلوفاز II باعث افزایش راندمان در تکنیک انتقال هسته می شود (۱۷). الحاق کاریوپلاست دهنده به یک تخمک بی هسته شده و فعال سازی بعدی این جفت یکی از مراحل مهم مورد نیاز برای تولید موفق فرزندان زنده توسط انتقال هسته سلول سوماتیک می باشد. در حالی که فیوژن الکتریکی کاریوبلاست دهنده به تخمک بی هسته معمول ترین روش به کار رفته شناخته شده است، چندین روش فعال سازی و زمان مراحل فعال سازی برای آغاز فرآیند تکوین جنین در گونه های اهلی متعدد به چاپ رسیده است (۲۳). مطالعه حاضر نشان می دهد که روش پیشنهادی برای فعال سازی تخمکهای باز سازی شده، مواجه شدن با یونومایسین به مدت ۵ دقیقه و 6DMAP به مدت ۵ ساعت می باشد. تخمکهای فعال شده با این روش میزان کلیواژ و تکوین مناسبی (۵۲ درصد) را نشان داد. افزایش زمان مواجه شدن با یونومایسین منجر به تولید جنینهای پارتنوژنیک گردید. نتایج مطالعات قبلی نشان می دهد انکوباسیون طولانی در 6DMAP نیز منجر به مهار حرکت کروموزوم در مرحله آنافاز و تلوفاز II و در نتیجه مهار خروج جسمک قطبی دوم در تخمکهای موش (۱۷)، گاو (۲۷) ، گوسفند (۲۱) و خوک (۲۰) می شود. 6DMAP مهار خروج جسمک قطبی دوم را توسط غیر فعال کردن MAPK انجام می دهد (۱۶).

در این مطالعه، جنینها در مرحله چهار تا هشت سلولی به اویداکت بز پذیرنده انتقال یافت. مدت کوتاه کشت در آزمایشگاه موجب کاهش تأثیرات شرایط آزمایشگاهی بر روی جنینها می شود. همزمانی رحم پذیرنده ها با سن جنین تأثیر مستقیم در ایجاد بارداری موفق دارد. جنینها در مرحله ۴–۸ سلولی به پذیرنده هایی که ۶۰–۴۸ ساعت قبل متحمل فاز استروس شده بودند، انتقال یافتند. تخمک گذاری پذیرنده ها ۶۰ ساعت قبل از انتقال جنین، صورت گرفته بود. این همزمانی، تلاشی برای جبران تکوین آهسته جنینهای بازسازی شده است.

دو بارداری با انتقال جنینهای NT مشتق از رده سلولی ترانسفکت شده با فاکتور IX انعقادی انسان به دست آمد (۱۶درصد). یکی از آنها در ۶۹ روزگی سقط شد و بارداری دوم منجر به تولد بزغاله های دو قلو گردید نتیجه به دست آمده بیشتر از میزان بارداری به دست آمده از مطالعه Baguisi و همکاران در سال ۱۹۹۹ بود (۱).

در ادامه واکنش PCR روی DNA ژنومیک حیوانات متولد شده صورت پذیرفت و تعیین توالی محصولات PCR و تطبیق آنها در بانک ژنی تراریختگی بزغاله ها را تأیید کرد. البته از آنجایی که دو بزغاله متولد شده در مطالعه حاضر از نظر ژنتیکی یکسان بوده ولی در رنگ پوست تفاوت داشتند، می توان این تفاوت را حاکی از یک صفت وابسته به X یا کنترل شده به وسیله پدیده های اپی ژنتیک دانست.

منابع

1. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, et al. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotech. 17:456–61.
2. Bassarre H, Keefer C, Wang B, Lazaris A, Karatzas CN. 2003. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. Cloning Stem Cells. 5:279–85.
3. Behboodi E, Ayres SL, Memili E, O'Coin M, Chen LH, Reggio BC, et al. 2005. Health and reproductive profiles of malaria antigenproducing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. Cloning Stem Cells. 7:107–18.
4. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T,Wells D, L'Huillier P, Laible . 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-

www.SID.ir

Archive of SID

casein and kappa-casein. Nat Biotechnol. 21:157–62.

5. Brownlee G G. 1987. The molecular pathology of haemophilia B. Fourth Wellcome Trust lecture. Biochem. Soc. Trans. 15(1): 1-8.
6. Campbell KH. 1999. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle. Cloning 1, 3–15.
7. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C et al. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science.* 280: 1256–1258.
8. He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, GavinW, Keefer C. 2006. Developmental expression of pluripotency determining factors in dairy goat embryos: novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. Mol Reprod Dev. 73:1512–22.
9. Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 32: 107–21.
10. Huang YJ, Huang Y, Baldassarre H, Wang B, Lazaris A, Leduc M, et al. 2007. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:13603–8.
11. Jang G, Bhuiyan MM, Jeon HY, Ko KH, Park HJ, Kim MK, Kim JJ, et al. 2006. An approach for producing transgenic cloned cows by nuclear transfer of cells transfected with human alpha 1-antitrypsin gene. Theriogenology. 65:1800–12.
12. Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ and Robl JM. 2001. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod.* 64: 1487–1493.
13. Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ and Robl JM (2001b) Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 19: 1176–1178.
14. Keefer CL. 2004. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. Anim Reprod Sci. 82–83:5–12.
15. Kurosaka S, Nagao Y,Minami N, Yamada Mand Imai H. 2002. Dependence of DNA synthesis and *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos on the stage of the cell cycle of donor cells and recipient cytoplasts. *Biol Reprod.* 67: 643–647.
16. Lan GC, Han D, WU YG, Han ZH, MA SF, Liu XY, Chang CH, Tan JH. 2005. Effects of Duration, Concentration, and Timing of Ionomycin and 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) Treatment on Activation of Goat Oocytes. Molecular Reproduction and Development. 71:380–388.
17. Lan GC, Wang ZY, Ma SF, Miao YL, Tan JH. 2002. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by ethanol and 6-DMAP. Chin J Cell Biol. 24:307–309.
18. Lavine G. 2009. FDA approves first biological product derived from transgenic animal. Am J Health Syst Pharm. 66:5–18.
19. Lazaris A, Rebecca K, Karatzas CN, Keefer CL. 2006. Transgensis using nuclear transfer in goats. Methods Mol Biol. 348:213–25.
20. Leal CL, Liu L. 1998. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histoneH1 kinase activity in pig oocytes. Anim Reprod Sci. 52:51–61.
21. Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, Cappai P, Moor RM. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. Biol Reprod. 58:1177–1187.
22. Maga EA, Shoemaker CF, Rowe JD, Bondurant RH, Anderson GB, Murray JD. 2006. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. J Dairy Sci. 89:518–24.
23. Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destrempes M, Williams J, Lewis T, Behboodi E, Ziomek C, Meade H, Echelard Y, Gavin W. 2005. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 63(6):1549-63.
24. Melo EO, Sousa RV, Igum LT, Franco MM, Rech EL, Rumpf R. 2005. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. Genet Mol Res. 4:812–21.
25. Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, et al. 2006. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. J Biotechnol. 122:362–71.
26. Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, et al. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. Biol Reprod. 66:1001–5.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Rho GJ,Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. Mol Reprod Dev. 50:485–492.

28. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810–813.

29. Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. 1998. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. J Biotechnol. 65: 99–110.

30. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. Nat Genet. 39:295–302.

31. Zhang J, Li L, Cai Y, Xu X, Chen J, Wu Y, et al. 2008. Expression of active goats. Protein Expr Purif. 57:127–35.

32. Zhao MT, Lin H, Liu FJ, Quan FS, Wang GH, Liu J, et al. 2009. Efficiency of human lactoferrin transgenic donor cell preparation for SCNT. Theriogenology. 71:376–84.

www.SID.ir

Production of Transgenic Goats, Carrying Human Coagulation Factor IX cDNA, by Nuclear Transfer of Transfected Fetal Fibroblasts

Dalman Azam[2+], Amiri Yekta Amir[1+], Eftekhari-Yazdi Poopak[2+], Sanati Mohammad Hossein[1,3+], Shahverdi AbdolHossein[2], Fakheri Rahman[2], Vazirinasab Hamed[1], Daneshzadeh Mohammad Taghi[4], Vojgani Mahdi[5], Zomorodipour Alireza[1,3], Fatemi Nayyeralsadat[1], Vahabi Zeinab[2], Masoudi najmehsadat[1], Rezazadeh Valojerdi Mojtaba[2]*, and Gourabi Hamid[1]*

[1]**Dept. of Genetics, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran**

[2]**Dept. of Embryology, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran**

[3]**Dept. of Genetics, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran Iran**

[4]**Dept. of Laboratory Animal Science, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran**

[5]**Dept. of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran**

Abstract

There are a growing number of recombinant proteins that have been expressed in milk and one can consider putting any gene of interest under the control of the regulatory elements of a milk protein gene in a dairy farm animal. Nuclear transfer (NT) using donor cells are an efficient means for generation of transgenic animals. In this study in order to produce a transgenic goat with capability of secretion of recombinant human coagulation factor IX (rhcfIX) in the milk, a gene construct (pBC1-hfIX) was made by insertion of (rhcfIX) cDNA after goat beta-casein promoter into the expression cassette. Then, cell lines of goat fetal and adult fibroblasts were transfected by pBC1-hfIX. Fetal fibroblast cells isolated from day 35 to day 40 fetuses. Next, positive clones (the fibroblast cells that contain the gene construct) were selected and confirmed by PCR. The transfected fetal fibroblast cells were allowed to reach confluency and further cultured in 15% FBS in DMEM for an additional 72 h (full confluency) to synchronize G0/G1 cell cycle stage cells. Immature oocytes were obtained from slaughterhouse and matured before enucleation and NT. The reconstructed oocytes electrofused with donor somatic cells, and activated with ionomycin and 6DMAP. Reconstructed embryos were transferred into synchronized recipients. A total of 64 embryos derived from transgenic fetal fibroblast cells were transferred into 12 recipients. Two recipients (16.6%) were confirmed pregnant at Day 42 by ultrasound. Of these, two kids derived from the fetal fibroblast cell line. Presence of the coagulation factor IX gene was confirmed by polymerase chain reaction, sequencing, and fluorescent in situ hybridization analyses. These results demonstrate that goat fetal fibroblasts with human coagulation IX factor gene can direct full-term development following NT. This is the first live born of transgenic farm animal in Iran.

Keywords: Human Coagulation Factor IX, Goat, Transgenic, Somatic Cell Nuclear Transfer, Fibroblast

+ Equally first authors

* Equally correspondents:

www.SID.ir