Archive of SID

DOI: 10.22055/ivj.2019.184521.2134

تأثیر شرایط محیطی و پارامترهای اسپرم در ترانسفکشن اسپرم گوسفند با DNA خارجی

خسرو حسینی‌پژوه[1*] و پرویز تاجیک[2]

[1] استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، تهران، ایران

[2] استاد گروه گروه مامایی و بیماریهای تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۶

چکیده

انتقال ژن به واسطه‌ی اسپرم (SMGT) برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ معرفی شد و از همان زمان موضوعی چالش‌انگیز بوده است. از جمله چالش‌های جدی آن عدم تحرک اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و در نتیجه قابلیت لقاح این اسپرم‌ها بوده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر شرایط محیطی گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA خارجی و محیط ترانسفکشن و همچنین تأثیر پارامترهای اسپرم در میزان ترانسفکشن اسپرم گوسفند است. در این تحقیق اثر دمای مختلف انکوباسیون (۵، ۲۰ و ^{o}C ۳۷)، سه محیط مختلف (PBS، TCM و DMEM)، حضور FBS در محیط، زنده‌مانی و تحرک اسپرم و ظرفیت‌پذیری اسپرم در میزان و شدت جذب DNA با استفاده از پلاسمید EGFP نشان‌دار شده با رودامین ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که گرمخانه‌گذاری اسپرم‌ها با پلاسمید در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد میزان جذب بیشتری به دنبال داشت اما محیط‌های مختلف مورد بررسی و حضور یا عدم حضور FBS اثر معنی‌داری در میزان ترانسفکشن اسپرم نداشتند. همچنین میزان تحرک اسپرم و ظرفیت‌گیری اسپرم‌ها نیز اثر معنی‌داری در میزان جذب نداشتند. در همه‌ی آزمایشات انجام شده تمام اسپرم‌های داری جذب واقعی DNA خارجی (جذب در ناحیه‌ی پشت آکروزوم) غیرمتحرک بودند و تغییر فاکتورهای مورد آزمایش نتوانست اسپرم ترانسفکت شده متحرک به دست بدهد. با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد که می‌توان از اسپرم‌های با غشای آسیب دیده همراه با تزریق داخل سیتوپلاسمی این اسپرم‌ها جهت انتقال ژن به واسطه‌ی اسپرم (SMGT-ICSI) برای تولید حیوانات ترانس ژنیک استفاده کرد.

کلمات کلیدی: انتقال ژن، اسپرم، گوسفند، شرایط محیطی

مقدمه

در طول دو دهه گذشته، روش‌های زیادی برای انتقال ژن به ژنوم حیوانات اهلی معرفی شده است. تزریق به داخل پیش هسته‌ی اولین تکنیکی بوده که توانست موش‌های تراریخته ایجاد کند و از آن به بعد برای ایجاد سایر گونه‌های تراریخته استفاده شد (Gordon & Ruddle, 1981)، اما به دلیل معایب زیاد همچون بازدهی بسیار کم به خصوص در دام‌ها و هزینه‌ی بالا استفاده از تکنیک‌های جایگزین برای انتقال ژن مطرح گردید.

*نویسنده مسئول : خسرو حسینی‌پژوه، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، تهران، ایران

E-mail: pajooh@irost.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

روش SMGT اولین بار در موش به عنوان یک حیوان کوچک مدل به کار گرفته شد که بنا بر ادعای مولفین با موفقیت بالا (۳۰ درصد) همراه بود (Lavitrano et al., 1989). اتصال و ورود DNA خارجی به اسپرم موش (Lavitrano, French, Zani, Frati, & Spadafora, 1992)، گاو (Atkinson et al., 1991)، خوک (Lavitrano et al., 2003)، اسب، گربه (Pereyra-Bonnet et al., 2008)، انسان (Camaioni et al., 1992) و بعضی گونه های دیگر گزارش شده است. در مقایسه با سایر روش‌های ایجاد جانوران تراریخته، SMGT روشی ساده‌تر و کم هزینه‌تر است. با این حال محققین مختلف نتایج کاملاً متفاوتی را از کارایی این روش گزارش کرده‌اند. گرچه بعضی محققین نتایج بسیار خوبی را با این روش گزارش کرده‌اند (تا ۸۰ درصد موفقیت در تولید رویان تراریخته در خوک) (Lavitrano et al., 2003) اما به نظر می‌رسد هنوز کارایی آن مورد مناقشه است. روش انتقال DNA خارجی توسط اسپرم به تخمک نیز هنوز به خوبی درک نشده است. با استفاده از پلاسمید نشان‌دار شده با رودامین حاوی ژن GFP در جذب خود به خودی DNA توسط اسپرم گاو مشاهده شده است که تقریباً نیمی از اسپرم‌ها DNA خارجی را جذب کرده بودند و تنها اسپرم‌های زنده این توانایی را داشتند. همچنین نشان داده شد که این تجمع اساساً در ناحیه‌ی پشت آکروزوم در سر اسپرم است (Anzar & Buhr, 2006). Wang نیز با گرمخانه‌گذاری اسپرم خرگوش (تازه یا کاملاً ظرفیت‌گیری شده) با DNA پلاسمید لیبل شده با تترامتیل رودامین 6-dUTP نشان داد که DNA وارد شده عمدتاً در ناحیه‌ی خلفی سراسپرم تجمع داشته است (Wang, Lin, & Chen, 2003). برای بهبود ورود DNA خارجی به اسپرم روش‌های مختلفی از جمله استفاده از حامل‌های لیپوزومی و غیر لیپوزومی (Arias, Sanchez-Villalba, Delgado, & Felmer, 2017; Hoseini Pajooh, Tajik, Karimipoor, & Behdani, 2016; Rubessa, Lotti, Kandel, Popescu, & Wheeler, 2019) و یا عوامل صدمه زننده به غشاء اسپرم (Hassanane et al., 2017; Hoseini Pajooh et al., 2016; Li et al., 2006) به کار گرفته شده است که باز هم نتایج به دست آمده متفاوت بوده است.

در آزمایشات قبلی ما در ترانسفکشن اسپرم گوسفند با پلاسمید نشان‌دار شده با رودآمین گرچه در صد بالایی از اسپرم‌ها توانسته بودند این پلاسمید را جذب کنند اما هیچ اسپرم متحرکی که دارای جذب واقعی پلاسمید (جذب در ناحیه‌ی پشت آکروزوم) باشد به دست نیامد (Hoseini pajooh, Tajik, Karimi poor, & Behdani, 2014; Hoseini Pajooh et al., 2016; Hoseini Pajooh, Tajik, & Karimipour, 2014). گفته شده است که شرایط گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA خارجی مثل دما و محیط، وجود سرم و BSA در محیط و حضور پلاسمای منی و همچنین پارامترهای اسپرم می‌تواند در ترانسفکشن اسپرم مؤثر باشد (Lavitrano et al., 2003). در این مطالعه تأثیر شرایط محیطی (دما، محیط کشت و سرم) و پارامترهای اسپرم (تحرک، زنده بودن، ظرفیت‌پذیری) در ترانسفکشن اسپرم گوسفند بررسی شد.

مواد و روش کار

از پلاسمید pEGFP که توسط آنزیم StuI (EcoR147) شرکت Fermentas)، برش داده شد و جهت ردگیری اتصال پلاسمید به اسپرم با استفاده با ماده‌ی فلورسنت رودآمین (tetramethyl – Rhodamine – 5 – dutp شرکت Roch) نشان‌دار شده بود برای ترانسفکشن اسپرم استفاده شد.

اسپرم اپیدیدیمی از ۶ بیضه گوسفند (مگر آن که تعداد آن ذکر شده باشد) تهیه شده از کشتارگاه و بر اساس روش Blash و همکاران (Blash, Melican, & Gavin, 2000) به دست می‌آمد. بدین منظور پس از انتقال بیضه در کنار یخ به آزمایشگاه، با برش ناحیه‌ی دم اپیدیدیم و با استفاده از پیپت، اسپرم جمع‌آوری و به لوله‌ی ۲ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط TCM 199 (شرکت Gibco) منتقل می‌شد. سپس اسپرم‌ها از نظر کیفیت مورد ارزیابی قرار می‌گرفت و تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک بررسی می‌شد. نمونه‌هایی که بالای ۹۵ درصد اسپرم متحرک داشته

www.SID.ir

Archive of SID

مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در نهایت تعداد ۱×۱۰^{۶} اسپرم به لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی محیط TCM و ۱۰۰ نانوگرم پلاسمید اضافه می‌شد، به طوری که حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر می‌رسید. سپس تعلیق اسپرم در محیط ترانسفکشن در انکوباتور ۳۷°C (یا دمای مورد بررسی) و ۵ درصد CO2 برای زمان‌های مورد نظر قرار داده می‌شد. گروه‌های کنترل تحت همان شرایط اما بدون افزودن DNA پلاسمید تهیه می‌شدند.

پس از مدت زمان لازم برای انکوباسیون، ابتدا اسپرم‌ها از لحاظ میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ NIKON (ECLIPSE E600) و با بزرگنمایی ۴۰ با نور مرئی مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. برای ارزیابی حداقل ۳ میدان میکروسکوپی و جمعیت ۱۰۰ اسپرم بررسی می‌شد. برای تعیین صحت ارزیابی تحرک به طور متناوب با ارزیابی انجام شده روش CASA مقایسه می‌شد.

بررسی درصد، شدت و نحوه جذب DNA خارجی توسط میکروسکوپ فلورسنت (ECLIPSE NIKON E600) و با استفاده از طول موج ۵۱۰nm–۵۸۰ (فیلتر سبز) و بزرگنمایی ۱۰۰ انجام شد. جذب پلاسمید با مشاهده‌ی تابش قرمز درخشان مشخص می‌شد. برای تعیین درصد جذب حداقل ۱۰۰ اسپرم در حداقل ۴ میدان میکروسکوپی مورد بررسی قرار می‌گرفت. بدین منظور ۶ میکرولیتر از نمونه توسط یک پیت سمپلر که سر سمپلر آن از قبل بر روی صفحه گرم ۳۷°C قرار داشت بر روی یک لام که آن نیز با قرار دادن روی صفحه‌ی گرم به ۳۷°C رسیده بود قرار داده می‌شد و سپس توسط لامل پوشیده می‌شد. برای ارزیابی شدت جذب نیز بر اساس شدت فلورسانت ایجاد شده جذب به چهار درجه ۱: بسیار ضعیف (حداقل بازتاب قابل تشخیص)؛ ۲: ضعیف، اما به خوبی قابل تشخیص ۳: قوی، کاملاً درخشان؛ ۴: بسیار قوی، بسیار پر درخشش تقسیم می‌شدند.

در این مطالعه آزمایشات زیر انجام شد:

۱- اثر دمای گرمخانه‌گذاری در میزان جذب پلاسمید: برای بررسی تأثیر دمای گرمخانه‌گذاری بر جذب DNA خارجی، از هر نمونه ۱×۱۰^{۶} اسپرم درسه دمای ۵، ۲۰ (دمای اتاق) و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با پلاسمید مورد بررسی انکوبه شدند. پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری اسپرم‌ها از نظر درصد جذب و شدت جذب بررسی شدند.

۲- اثر انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی در سه محیط مختلف: برای بررسی اثر انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی در سه محیط TCM199 ، DMEM و PBS در میزان و شدت جذب DNA خارجی، هر نمونه اسپرم در هر یک از سه محیط فوق به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه با پلاسمید انکوبه شدند؛ و سپس اسپرم‌ها از نظر میزان و شدت جذب DNA خارجی و تحرک بررسی شدند.

۳- بررسی اثر اضافه کردن FBS به محیط ترانسفکشن در میزان جذب پلاسمید و تحرک اسپرم: از آن جایی که میزان تحرک در اسپرم‌های مورد بررسی پایین بود و از جمله تمام اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی بی تحرک بودند، برای بررسی آن که حضور FBS در محیط گرمخانه‌گذاری دارای اثر مثبت در تحرک اسپرم‌ها به خصوص اسپرم‌های حاوی پلاسمید و یا دارای اثر منفی در جذب DNA خارجی است این آزمایش انجام شد. در این آزمایش اسپرم‌ها در محیط TCM بدون FBS و یا حاوی ۱۰ درصد FBS تعلیق شده و برای ۶۰ دقیقه با پلاسمید مذکور در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس اسپرم‌ها از نظر میزان و شدت جذب و تحرک ارزیابی شدند.

۴- بررسی اثر تحرک اسپرم در جذب پلاسمید به دنبال Swim up و غیرفعال کردن اسپرم‌ها با حرارت: این آزمایش برای بررسی این که آیا اسپرم‌های متحرک بهتر DNA خارجی را جذب می‌کنند یا اسپرم‌های غیر متحرک، انجام شد. با انجام Swuim up به مدت ۶۰ دقیقه اسپرم‌های متحرک از غیرمتحرک یا با تحرک کم جداسازی شدند. سپس اسپرم‌های جمع‌آوری شده از مایع رویی به عنوان

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های باقی‌مانده در ته لوله به عنوان اسپرم‌های غیرمتحرک یا کم‌تحرک به مدت ۳۰ دقیقه با پلاسمید انکوبه شده و سپس از نظر میزان جذب بررسی شدند.

همچنین در روشی دیگر برای به دست آورن اسپرم‌های غیرمتحرک، از هر نمونه اسپرم یک قسمت برای مدت ۷ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده تا بی‌تحرک شوند (Heat inactivation). سپس اسپرم‌های متحرک و غیرمتحرک با ۵۰ نانوگرم پلاسمید انکوبه شدند. پس از ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری اسپرم‌ها از نظر درصد و شدت جذب بررسی شدند.

۵- بررسی اثر ظرفیت‌گیری اسپرم در جذب پلاسمید: در این آزمایش از هر نمونه اسپرم یک قسمت بلافاصله و قسمت دیگر پس از ۳ ساعت ماندن در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه با پلاسمید انکوبه شدند. سپس میزان و شدت جذب پلاسمید بررسی شد.

۶- بررسی اثر قابلیت حیات در جذب پلاسمید: برای بررسی این که آیا اسپرم مرده توانایی جذب DNA خارجی دارد، دو آزمایش انجام شد.

در آزمایش اول اسپرم‌های اخذ شده از ۵ بیضه تهیه شده از کشتارگاه پس از بررسی اولیه و تعلیق در سه لوله حاوی محیط TCM تقسیم شدند. یک قسمت بدون اضافه کردن سرما محافظ، سه بار متوالی منجمد ـذوب شد. به اسپرم‌های لوله دوم هم حجم آن آب مقطر اضافه شد تا باعث مرگ سلول‌ها شود. بر اسپرم‌های قسمت سوم هیچ تیماری انجام نگرفت. سپس از هر نمونه ۱×۱۰^{۶} اسپرم در ۲۰ میکرولیتر محیط حاوی ۱۰۰ نانو گرم پلاسمید نشان‌دار مذکور تعلیق شده و پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶/۰) استفاده شد. اطلاعات به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین (mean±SEM) بیان شده‌اند و به روش تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) تحلیل شده‌اند. هنگامی که آزمایش تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد مقادیر با آزمون دانکن به صورت جفت‌جفت مقایسه می‌شدند. در مواردی که مقایسه بین دو متغیر بود از روش آزمون تی جفت شده (Paired sample t test) استفاده شد. تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌داری محسوب می‌شدند.

نتایج

اثر دمای گرمخانه‌گذاری در میزان جذب پلاسمید: درصد اسپرم‌های دارای DNA خارجی و شدت جذب پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در ۵، ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در Table 1 آمده است. نتایج نشان می‌دهد پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری اختلاف معنی‌داری بین گرمخانه‌گذاری در ۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در درصد و شدت جذب وجود داشت، اما اختلاف معنی‌داری در درصد جذب بین گرمخانه‌گذاری در ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در این زمان‌ها وجود نداشت. گرچه شدت جذب در اسپرم‌های انکوبه شده در ۳۷ درجه پس از ۶۰ دقیقه به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. اختلاف بین گرمخانه‌گذاری در ۵ و ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در درصد جذب تنها پس از ۶۰ دقیقه معنی‌دار بود اما اختلافی در شدت جذب در گرمخانه‌گذاری در ۵ و ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه وجود نداشت. تصویری از بازتاب فلورسنت اسپرم‌های با جذب DNA خارجی در Fig 1 نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

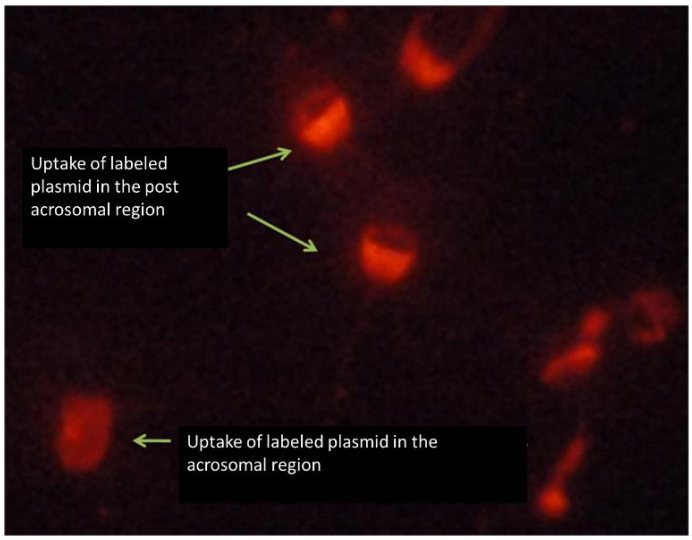

Fig. 1 uptake of Rhodamine-labled plasmid by spermatozoa. Homogeneous illumination in acrosome region (real uptake) and post acrosome region (fals uptake).

Table 1. Rate of DNA absorption and uptake intensity after 30 and 60 minutes incubation in 5, 20 and 37 degrees centigrade

	Incubation time (Min)	Incubation temperature (centigarade)		
		37	20	5
Absorption rate (%)	30	39.16 ±2.77	26.00 ±2.97	15.83 ±6.90
	60	48.66 ±1.02	42.66 ±1.70	31.83± 5.87
uptake intensisty	30	2.80 ±0.12	2.50 ±0.18	1.66± 0.54
	60	3.30 ±0.16	3.66 ±0.21	2.58± 0.23

اثر انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی در سه محیط مختلف: نتایج حاصل از انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی در سه محیط DMEM، PBS و TCM199 در Table 2 آمده است که تفاوت معنی‌دار بین این سه محیط در درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب پس از ۱۵ و ۳۰ دقیقه انکوباسیون وجود نداشت.

Table 2. Rate of DNA absorption and uptake intensity after 30 and 60 minutes incubation in DMEM ،PBS and TCM199

	Incubation time (Min)	Incubation media		
		TCM199	PBS	DMEM
Absorption rate (%)	30	43.66±4.05	47.33±2.90	41.66±4.70
	60	56.33±2.33	58.66±2.03	55.66±1.85
uptake intensisty	30	3.00±0.00	3.16±0.16	3.16±0.16
	60	3.33±0.16	3.16±0.16	3. ±0.16

اثر اضافه کردن FBS به محیط گرمخانه‌گذاری: درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS به ترتیب عبارت بودند از SE ۵۳/۰۰±۳/۳۴ و SE ۵۴/۵۰±۱/۹۲ و در محیط بدون FBS به ترتیب عبارت بودند از SE۰/۱۶± ۳/۱۶ و SE ۳/۲۵±۰/۱۱. همچنین میزان تحرک کل نیز به ترتیب عبارت بودند از SE ۳۵/۱۶±۴/۰۱ و SE ۲۶/۵±۵/۲۶ که این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر تحرک اسپرم در جذب پلاسمید: در بررسی اسپرم‌های به دست آمده از مایع رویی swim up (متحرک) و اسپرم‌های موجود در ته لوله (کم‌تحرک) گرچه میزان تحرک اسپرم‌های swim up شده و اسپرم‌های موجود در ته لوله کاملاً تفاوت داشتند اما درصد جذب در این اسپرم‌ها به ترتیب ۱/۷۲ ±۴۵/۲۲ و ۱/۹۱±۳۲/۱۱ و شدت جذب به ترتیب ۰/۱۲± ۳/۲۲ و ۰/۱۸± ۲/۲۶ بود که اختلاف معنی‌دار باهم نداشتند. لذا کاهش تحرک اسپرم تأثیری بر جذب DNA خارجی نداشت.

در بررسی اثر تحرک اسپرم در جذب پلاسمید به دنبال غیرفعال کردن اسپرم‌ها با حرارت، میزان تحرک کل در اسپرم‌های حرارت ندیده پس از ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری با پلاسمید به ترتیب ۲/۷۷±۵۷/۰۰ و ۳/۶۳±۴۸/۰۰ و ۳/۳۱±۴۱/۰۰ درصد و در اسپرم‌های حرارت دیده همان‌طور که انتظار می‌رفت صفر بود. درصد جذب پلاسمید و شدت جذب برای این اسپرم‌ها در Table 3 آمده است.

Table 3. Effect of sperm motility after heat-inactivation on the rate of DNA absorption and uptake intensity

Sperm motility	Incubation time (Min)	60	30	15
+	Absorption rate (%)	40.60±4.1	32.80±4.22	23.60±2.65
	uptake intensisty	3.10±0.22	2.90±0.10	2.50±0.15
−	Absorption rate (%)	39.60±4.1	33.60±2.85	26.00±2.00
	uptake intensisty	2.9±0.22	2.70±0.12	2.00±0.00

بررسی اثر ظرفیت‌گیری اسپرم در جذب DNA خارجی: درصد جذب پلاسمید نشان‌دار توسط اسپرم‌هایی که بلافاصله پس آماده‌سازی در معرض پلاسمید قرار گرفتند و اسپرم‌هایی که پس از ۳ ساعت ماندن در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در معرض پلاسمید قرار گرفتند به ترتیب عبارت بودند از: ۲/۵۵±۴۴/۲۸ درصد و ۱/۳۲±۴۱/۶۲ درصد همچنین شدت جذب در این اسپرم‌ها به ترتیب عبارت بودند از: ۰/۱۷±۲/۹۷ و ۰/۱۳±۲/۶۸ درصد؛ که اختلاف بین این دو تیمار در هر دو مورد معنی‌دار نبود.

اثر قابلیت حیات بر میزان ترانسفکشن: بررسی اسپرم‌های اپیدیدیمی انکوبه شده با پلاسمید به دنبال سه بار انجماد – ذوب نشان داد که همه این اسپرم‌ها دارای جذب DNA خارجی در ناحیه‌ی پشت آکروزوم بودند. الگوی جذب در این سلول‌ها مشابه الگوی معمول جذب اسپرم‌های تیمار نشده بود؛ یعنی بازتاب فلوروسنس در دو ناحیه‌ی آکروزوم (در همه‌ی اسپرم‌ها) و پشت آکروزوم (در بعضی اسپرم‌ها) مشاهده می‌شد. در نمونه‌های کشته شده با کاهش فشار اسمزی نیز جذب در همه‌ی اسپرم‌ها دیده می‌شد، میزان جذب در گروه شاهد ۲/۱۱±۴۷/۶۰ درصد بود. البته در شدت جذب DNA خارجی اختلاف معنی‌دار بین دو گروه ذوب– انجماد و کشته‌شده با کاهش فشار اسمزی با گروه شاهد وجود نداشت (به ترتیب ۰/۲۲±۳/۵۰، ۰/۲۲±۳/۳۶ و ۰/۱۰±۳/۱۰).

بحث

یک نکته مهم در انتخاب اسپرم توانایی آن برای اتصال به DNA و به داخل هسته بردن آن است. همچنان لازم است تا اسپرم ترانسفکت شده عملکرد خود را برای باروری تخمک حفظ کند. بعضی یافته‌ها نشان می‌دهد که در کارایی روش SMGT کیفیت نمونه‌ی اسپرم که عمدتاً

www.SID.ir

Archive of SID

به قابلیت حیات و تحرک اسپرم به خصوص به حرکت پیشرونده‌ی اسپرم بستگی دارد مهم است (Lavitrano et al., 2003). بعضی مطالعات نشان می‌دهد که فقط اسپرم‌های زنده قابلیت حمل DNA خارجی (Cabrera et al., 1997) و داخل کردن آن به هسته را دارند (Anzar & Buhr, 2006 Gandolfi, 1998;). به طوری که گفته می‌شود تحرک در آغاز باید ۸۰ درصد و بعد از شستشو (در اسپرم انزالی) بیش از ۶۵ درصد باشد (Sciamanna et al., 2000). به علاوه محیط و شرایط محیطی گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA خارجی نیز می‌تواند با تأثیر بر اسپرم بر میزان ترانسفکشن اسپرم مؤثر باشد.

دمای انکوباسیون: در تحقیقات مختلف در زمینه‌ی SMGT، گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA خارجی در دماهای ۵، ۱۷، ۲۲ یا ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شده است. در بررسی حاضر به دنبال گرمخانه‌گذاری اسپرم با DNA خارجی در دماهای ۴، ۲۲ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، اختلافی در درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی انکوبه شده در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با اسپرم‌های انکوبه شده در ۲۲ درجه دیده نشد، گرچه شدت جذب در اسپرم‌های انکوبه شده در ۳۷ درجه پس از ۶۰ دقیقه به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. هم درصد جذب و هم شدت جذب در اسپرم‌های انکوبه شده در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد از اسپرم‌های انکوبه شده در ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر بود. لذا به نظر می‌رسد دمای مناسب برای گرمخانه‌گذاری می‌تواند بین ۲۲ و ۳۷ درجه باشد. اگرچه شاید گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق به جای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد که با کم کردن تحرک اسپرم باعث حفظ انرژی اسپرم برای لقاح شده و فعالیت آندونوکلئازی اسپرم را نیز کاهش می‌دهد دمای مناسب‌تری قلمداد شود اما با توجه به آن که هیچ اسپرم حاوی DNA خارجی متحرکی در هیچ کدام از دماهای گرمخانه‌گذاری مشاهده نشد لذا بهترین دما می‌تواند همان ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد باشد. در یک بررسی برای انتقال DNA به واسطه اسپرم، مشاهده شد که گرمخانه‌گذاری اسپرم در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بهتر از ۴ و ۴۰ درجه بوده است (Kadze et al., 2002). گرچه Preyra–Bonet و همکاران در اسپرم‌های گوسفند گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۵ دقیقه در ۵ درجه‌ی سانتیگراد نتیجه‌ی بهتری از اسپرم‌هایی که به مدت ۲ ساعت در ۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود با لقاح به روش ICSI (۹۱/۶ درصد) به دست آوردند (Pereyra-Bonnet et al., 2011). در اسپرم منجمد ذوب شده خوک مشاهده شده است که دمای تیمار با DNA (۴، ۲۴، ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد) تأثیری بر تولید رویان‌های بیان کننده eGFP ایجاد شده به روش SMGT-ICSI نداشت (Wu et al., 2009).

درصد آپوپتوز در اسپرم‌های گاو گرمخانه‌گذاری شده با DNA خارجی و گروه شاهد در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (۴/۴۳ و ۲/۲۷) کم‌تر از دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (۵/۵۴ و ۳/۵۱) گزارش شده است (Canovas, Gutierrez-Adan, & Gadea, 2010).

محیط های مختلفی برای ترانسفکشن اسپرم استفاده شده است از جمله PBS، TCM، SFM، SP-TALP، Tyrod و optimem (Camaioni et al., 1992; Chung et al., 2015; García-Vázquez et al., 2010; Hoelker et al., 2007; Simões et al., 2012). در این مطالعه سه محیط PBS, TCM و DMEM مورد بررسی قرار گرفت که اختلاف معنی‌داری بین این محیط‌ها در میزان جذب DNA خارجی وجود نداشت.

اگر چه بعضی محققین وجود FBS یا BSA را در محیط گرمخانه‌گذاری به عنوان یک عامل ممانعت کننده برای جذب DNA توسط اسپرم دانسته‌اند (Anzar & Buhr, 2006 Eghbalsaied et al., 2009;) اما در مطالعه‌ی حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان ترانسفکشن اسپرم‌ها در محیط با و بدون FBS وجود نداشت. همچنین وجود سرم باعث افزایش معنی‌دار تحرک اسپرم‌ها و یا به دست آمدن اسپرم ترانسفکت شده متحرک نشد. در بعضی از گزارش‌ها اضافه کردن سرم پس از گرمخانه‌گذاری باعث متحرک شدن

www.SID.ir

Archive of SID

دوباره اسپرم‌های غیرمتحرک شده بود اما در این مطالعه اضافه کردن سرم پس از گرمخانه‌گذاری این نتیجه را به دست نداد. این نتایج در استفاده از BSA نیز نتایج مشابهی در بر داشت و تفاوتی در میزان ترانسفکشن مشاهده نشد (اطلاعات اینجا نیامده است). Wu و همکاران مشاهده کردند که وجود BSA در محیط ترانسفکشن اسپرم‌های منجمد- ذوب شده مرده تأثیری بر تولید رویان‌های بیان کننده eGFP ایجاد شده به روش SMGT-ICSI نداشت (Wu et al., 2009). به نظر می‌رسد اثر ممانعتی BSA و FBS بر ترانسفکشن اسپرم عمدتاً در هنگام ترانسفکشن با لیپوزوم‌ها مطرح باشد. نشان داده شده است BSA می‌تواند اثر ممانعت کننده بر جذب مجموعه‌ی لیپوزوم / DNA به سلول اسپرم داشته باشد (Wang et al., 2003 Zelphati & F C Szoka, 1996;).

یک پارامتر حیاتی در انتخاب اسپرم توانایی آن برای اتصال به DNA و به داخل هسته بردن آن است. همچنان لازم است تا اسپرم ترانسفکت شده عملکرد خود را برای باروری اُاُسیت حفظ کند. بعضی یافته‌ها نشان می‌دهد که در کارایی روش SMGT، کیفیت نمونه اسپرم که عمدتاً به قابلیت حیات و تحرک اسپرم به خصوص به حرکت پیش‌رونده اسپرم بستگی دارد مهم است (Lavitrano et al., 2003). اسپرم دارای تحرک خوب میزان بیش‌تری DNA را به خود می‌گیرد (Horan, Powell, McQuaid, & al., 1991). البته مشخص نشده است که این افزایش میزان اتصال ناشی از افزایش کارایی میان کنش با DNA و مکانیسم‌های به داخل بردن است یا صرفاً به خاطر آن است که اسپرم متحرک بیش‌تر در معرض DNA قرار می‌گیرد.

در مقابل بعضی تحقیقات نیز نشان داده است که احتمالاً DNA خارجی عمدتاً جذب اسپرم‌های بی‌تحرک یا با قابلیت حیات پایین و حتی مرده شده می‌شود (Eghbalsaied, et al, 2008; García-Vázquez, et al, 2009).

قبلا مشاهده کرده بودیم که تمام اسپرم‌هایی که دارای جذب مشخص پلاسمید نشان‌دار شده در ناحیه‌ی پشت آکروزوم بودند (جذب واقعی) بی‌تحرک بودند (Hoseini pajooh et al., 2014; Hoseini Pajooh et al., 2016; Hoseini Pajooh et al., 2014). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که هم در اسپرم‌هایی که به طور فیزیولوژیک تحرکشان کاهش یافته است (اسپرم‌های موجود در ته لوله به دنبال swim up) و هم در اسپرم‌هایی که در اثر حرارت غیرفعال شده‌اند درصد اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی و همچنین شدت جذب اختلاف معنی‌داری نداشتند با این که اسپرم‌های حرارت دیده کاملاً غیرمتحرک بودند. این نتیجه برای زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری اسپرم با پلاسمید یعنی ۱۵ تا ۶۰ دقیقه صادق بود.

بنابراین گرچه بعضی از محققین تحرک اسپرم را یکی از خصوصیات ضروری اسپرم برای جذب DNA خارجی دانسته‌اند (Lavitrano et al., 2003) اما ما نتوانستیم حداقل در اسپرم‌های بی‌حرکت شده توسط حرارت یا کم‌تحرک جدا شده از swim-up و یا کم‌تحرک ناشی از تراکم کم اسپرم تفاوت معنی‌داری با اسپرم‌های متحرک ببینیم؛ بنابراین گرچه تمام اسپرم‌هایی که دارای جذب در ناحیه‌ی پشت آکروزوم بوده‌اند در این آزمایش و آزمایشات قبلی ما و بعضی از مطالعات دیگر غیرمتحرک بودند، اما صرف بی-تحرک بودن اسپرم‌ها عامل جذب نبوده است. همچنان که تحرک اسپرم‌ها نیز عاملی برای جذب DNA خارجی نبود.

با این که گفته می‌شود فقط اسپرم‌های زنده قابلیت حمل DNA خارجی و داخل کردن آن به هسته را دارند (Anzar & Buhr, 2006; Gandolfi, 1998) و نشان داده شده است که ارتباط مستقیمی بین اتصال DNA خارجی، اسپرم و تمامیت غشای اسپرم وجود دارد (Anzar & Buhr, 2006; Perry et al., 1999)، اما از طرف دیگر نشان داده شده است که انجماد- ذوب اسپرم یا تیمار با تریتون X100 به شدت باعث افزایش اتصال DNA خارجی می‌شود گرچه روند دخول DNA نمی‌تواند کامل شود (Hoseini Pajooh et

www.SID.ir

Archive of SID

(al., 2016; Zhao et al., 2012). نگهداری در انجماد با تغییر در غشاء پلاسمایی اسپرم باعث نفوذ بیش‌تر DNA می‌شود. انجماد و ذوب اسپرم می‌تواند در افزایش جذب خود به خودی DNA توسط اسپرم مؤثر باشد. در اسپرم منجمد–ذوب شده به علت تغییر غشای پلاسمایی اسپرم به خاطر دمای پایین و غلظت نمکی زیاد میزان دخول DNA بیش‌تر است (Anzar & Buhr, 2006; Buhr, Canvin, & Bailey, 1989; Holt & North, 1984; Shannon & Vishwanath, 1995). Anzer با استفاده از پلاسمید حاوی ژن بیان کننده GFP و نشان‌دار شده با رودآمین نشان داد که کارایی ترانسفکشن در اسپرم‌های منجمد–ذوب شده بیش‌تر بود (Anzar & Buhr, 2006). Wu و همکاران اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده مرده خوک را در معرض مقادیر متفاوت پلاسمید حاوی eGFP قرار دادند (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میکروگرم در ml محیط). این غلظت‌ها در تکامل رویان‌های حاصل از ICSI اثر معنی‌داری نداشتند اما میزان بیان eGFP در غلظت‌های ۰۵/۰g µ و ۰/۱ µg بیشتر از µg ۰/۰۱ بود (Wu et al., 2009).

گزارش شده است که تیمار اسپرم با استرپتولیزن اُ که باعث افزایش نفوذپذیری غشاء اسپرم می‌شود باعث افزایش اتصال DNA خارجی به اسپرم از جمله ناحیه‌ی پشت آکروزوم می‌شود بدون این که اثر شدیدی بر یکپارچگی ژنوم اسپرم داشته باشد (Sanchez-Villalba et al., 2018). البته چه در مورد اخیر و چه در سایر تیمارهایی که باعث افزایش نفوذپذیری اسپرم می‌شود باید از روش ICSI برای لقاح استفاده کرد زیرا اسپرم توانایی تحرک و لقاح را از دست می‌دهد.

در آزمایش حاضر نشان داده شد که اسپرم‌های با غشاء صدمه دیده و مرده نه تنها قابلیت جذب DNA خارجی را دارا هستند بلکه میزان ترانسفکشن در این سلول‌ها بسیار بیش‌تر یعنی صددرصد است. الگوی این اتصال شبیه گروه کنترل در این آزمایش و آزمایشات قبلی بود که با نتایج بعضی از مطالعات هم‌خوانی داشت (F. A. García-Vázquez, García-Roselló, Gutiérrez-Adán, & Garcia-Vazques ,2009). Gadea و همکاران نشان دادند که در اسپرم‌های اپیدیدیمی و انزالی اتصال DNA عمدتاً مربوط به اسپرم‌هایی بود که مرده بودند یا قابلیت حیات کمی را نشان می‌دادند و رویان ترانسژنیک تنها با ICSI اسپرم‌های مرده یا بی‌تحرک به دست آمد (F. García-Vázquez et al., 2009). Shadanloo و همکاران نیز نشان دادند که تنها اسپرم‌های کشته شده با انجماد – ذوب و یا اسپرم‌های بی‌حرکت توانستند به روش ICSI تولید رویان ترانسژنیک کنند (Shadanloo et al., 2010). این گروه با تزریق همان مقادیر از DNA مورد آزمایش به تخمک و لقاح آن‌ها با اسپرم‌های تیمار نشده هیچ رویان ترانسژنیکی به دست نیاوردند. لذا با وجود مرده بودن اسپرم‌ها، آن‌ها در انتقال ژن دارای نقش فعالی بودند؛ بنابراین استفاده از اسپرم‌های با غشاء صدمه دیده اما با ژنوم سالم، یک روش جدید برای به دست آمدن میزان زیاد ترانسژن است.

در آزمایش حاضر اختلاف معنی‌داری در میزان و شدت جذب بین اسپرم‌هایی که کم‌تر از ۳۰ دقیقه پس از تهیه‌ی اسپرم با پلاسمید گرمخانه‌گذاری شدند و اسپرم‌هایی که بعد از ۳ ساعت ماندن در یخچال و ظرفیت‌گیری با پلاسمید گرمخانه‌گذاری شدند دیده نشد که با یافته‌های Wang و همکاران هم‌خوانی داشت (Wang et al., 2003). آن‌ها با گرمخانه‌گذاری اسپرم خرگوش (تازه یا کاملاً ظرفیت‌گیری شده) با DNA پلاسمید نشان‌دار شده با تترامتیل رودامین 6-dUTP و شمارش اسپرم‌های فلورسنت قبل و بعد از تیمار با DNaseI. نشان دادند که پلاسمید نشان‌دار شده با فلورسنت می‌تواند توسط اسپرم ظرفیت‌گیری شده خرگوش به داخل کشیده شود. همچنین Simões و همکاران تفاوت معنی‌داری در میزان تولید رویان‌های تراریخته بارور شده با اسپرم‌هایی که پس از ظرفیت‌گیری با DNA خارجی گرمخانه‌گذاری شده بودند و اسپرم‌هایی که بدون ظرفیت‌گیری با DNA خارجی گرمخانه‌گذاری شده بودند ندیدند (Simões et al., 2007). اقبال سعید و همکاران نیز از اسپرم کاملاً ظرفیت‌گیری شده گاو با

www.SID.ir

Archive of SID

موفقیت برای انتقال ژن به اسپرم استفاده کردند (Eghbalsaied et al., 2008). لذا به نظر می‌رسد می‌توان اسپرم تهیه شده را برای چند ساعت در یخچال نگهداری کرد.

نتایج این بررسی نشان داد که محیط‌های مختلف ترانسفکشن، حضور یا عدم حضور FBS و همچنین پارامترهای اسپرم مانند میزان تحرک، زنده‌مانی و ظرفیت-گیری اسپرم نیز اثرات مثبت یا منفی معنی‌داری بر میزان و شدت جذب DNA خارجی توسط اسپرم ندارند. البته جذب DNA در اسپرم‌های با غشاء صدمه دیده به میزان زیادی افزایش می‌یابد. همه‌ی اسپرم‌های داری جذب واقعی DNA خارجی غیرمتحرک بودند و هیچ یک از تیمارهای انجام شده در این بررسی نتوانست اسپرم متحرک ترانسفکت شده به دست بدهد؛ بنابراین استفاده از روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) برای لقاح توسط اسپرم‌های حاوی DNA خارجی ضروری به نظر می‌رسد. به علاوه تیمارهایی که باعث صدمه به غشاء اسپرم می‌شوند میزان بیشتری اسپرم حاوی DNA خارجی به دست می‌دهد؛ بنابراین SMGT-ICSI با استفاده از اسپرم‌های با غشاء صدمه دیده می‌توان مورد بررسی قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که در این مطالعه به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

منابع مالی

این بررسی با کمک مالی پژوهشگاه تحقیقات طب تجربی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد که بدینوسیله از این پژوهشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Anzar, M., & Buhr, M. (2006). Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology, 65*(4), 683-690 .

Arias, M. E., Sanchez-Villalba, E., Delgado, A., & Felmer, R. (2017). Effect of transfection and co-incubation of bovine sperm with exogenous DNA on sperm quality and functional parameters for its use in sperm-mediated gene transfer. *Zygote, 25*(1), 85-97. doi:10.1017/s096719941600037x

Atkinson, P. W., Hines, E. R., Beaton, S., Matthaei, K. I., Reed, K. C., & Bradley, M. P. (1991). Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. *Molecular Reproduction and Development, 29*(1), 1-5 .

Blash, S., Melican, D., & Gavin, W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology, 54*(6), 899-905.

Buhr, M. M., Canvin, A. T., & Bailey ,J. L. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research, 23*(4), 441-449. doi:10.1002/mrd.1120230409

Cabrera, M., Chan, P., Kalugdan, T., & King, A. (1997). Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 14*(2), 120-124. doi:10.1007/bf02765781

Camaioni, A., Russo, M., Odorisio, T., Gandolfi, F., Fazio, V., & Siracusa, G. (1992). Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *Reproduction, 96*(1), 203-212 .

www.SID.ir

Archive of SID

Canovas, S., Gutierrez-Adan, A., & Gadea, J. (2010). Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Molecular Reproduction and Development, 77*(8), 687-698. doi:10.1002/mrd.21205

Eghbalsaied, S., Ghaedi, K., Hosseini, S., Tanhaie, S., Forouzanfar, M., Hajian, M., . . . Nasr Esfahani, M. (2009). Selection of the Most Appropriate Medium for Assessing Motility and DNA Uptake of Bovine Spermatozoa. *Yakhteh Medical Journal,, 10*(4), 266-271 .

Eghbalsaied, S., Nasr-esfahani, M. H., Ghaedi, K., & Mozafari, N. (2008). Lipofectamine Does Not Enhance Bovine Sperm Transfection Efficiency *Yakhteh Medical Journal,* 10(1),48

Gandolfi, F. (1998). Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic Res, 7*(3), 147-155 .

García-Vázquez, F., Gutiérrez-Adán, A., & Gadea, J. (2009). Evaluation of binding sperm-exogenous DNA in ejaculate and epididimary porcine spermatozoa. *Archivos de Medicina Veterinaria, 41*(2), 131-138 .

García-Vázquez, F. A., García-Roselló, E., Gutiérrez-Adán, A., & Gadea, J. (2009). Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology, 72*(4), 506-518.

Gordon, J. W., & Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transformation of genes injected into mouse pronuclei. *Science, 214*, 1244-1246.

Hassanane, M. S ,.El Makawy, A. I., Helalia, S. M., Abdoon, A. S., Khalil, K. M. A., Ghanem, T. A., . . . Shen, W. (2017). First study of sperm mediated gene transfer in Egyptian river buffalo. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15*(2), 475-482.

Holt, W. V., & North, R. D. (1984). Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology, 230*(3), 473-483.

Horan, R., Powell, R., McQuaid, S., & al., e. (1991). *Archives of Andrology, 26*, 83-92 .

Hoseini pajooh, K., Tajik, P., Karimi poor, M., & Behdani, M. (2014). Tranfection of ram spermatozoa with pEGFP carrying human lysozyme gene. *Journal of Veterinary Resarch, 69*(3), 245-254 .

Hoseini Pajooh, K., Tajik, P., Karimipoor, M., & Behdani, M. (2016). Techniques for augmentation of exogenous DNA uptake by ovine spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research, 17*(1), 25-30 .

Hoseini Pajooh, K., Tajik, P., & Karimipour, M. (2014). Dynamics of interaction between ram sperm with plasmid carrying human lysozyme gene in SMGT. *Journal of Comparative Pathobiology, 11*,(3), 1331-1344 .

Kadze, R., Chan, P .J., Jacobson, J. D., Corselli, J. U., & King, A. (2002). Temperature variable and the efficiency of sperm mediated transfection of HPV16 DNA into cells. *Asian journal of andrology, 4*(3), 169-173 .

Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., & Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell, 57*(5), 717-723 .

Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M. L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H., & Seren, E. (2003). Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Molecular Reproduction* and *Development, 64*(3), 284-291.

Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., & Spadafora, C. (1992). The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Molecular Reproduction* and *Development, 31*(3), 161-169 .

Li, L., Shen, W., Min, L., Dong, H., Sun, Y., & Pan, Q. (2006). Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev, 18*(6), 689-695.

Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín, R., Olivera, R., Jarazo, J., Vichera, G., Gibbons, A., & Salamone, D. (2008). A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development, 20*(7), 741-749.

Pereyra-Bonnet, F., Gibbons, A., Cueto, M., Sipowicz, P., Fernandez-Martin ,R., & Salamone, D. (2011). Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the Ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization and ICSI. *Journal* of *Reproduction* and *Development, 57*, 188-196.

www.SID.ir

Archive of SID

Perry, A. C. F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., & Yanagimachi, R. (1999). Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Science, 284*(5417), 1180-1183. doi:10.1126/science.284.5417.1180

Rubessa, M., Lotti, S. N., Kandel, M. E., Popescu, G., & Wheeler, M. B .(۲۰۱۹) .SLIM microscopy allows for visualization of DNA-containing liposomes designed for sperm-mediated gene transfer in cattle. *Molecular Biology Reports, 46*(1), 695-703.

Sanchez-Villalba, E., Arias, M. E., Loren, P., Fuentes, F., Pereyra-Bonnet, F., Salamone, D., & Felmer, R. (2018). Improved expression of green fluorescent protein in cattle embryos produced by ICSI-mediated gene transfer with spermatozoa treated with streptolysin-O. *Anim Reprod Sci, 196*, 130-137. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.07.005

Sciamanna, I., Piccoli, S., Barberi, L., Zaccagnini, G., Magnano ,A. R., Giordano, R., . . . Spadafora, C. (2000). DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Molecular Reproduction* and *Development, 56*(2 Suppl), 301-305.

Shadanloo, F., Najafi, M. H., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Ghaedi, K., . . . Esfahani, M. H. N. (2010). Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. *Molecular Reproduction and Development, 77*(10), 868-875.

Shannon, P., & Vishwanath, R. (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science, 39*(1), 1-10.

Simões, R., Binelli, M., Nicacio, A. C., Milazzotto, M. P., Feitosa, W. B., Visintin, J. A., & Assumpção, M. E. O. A. (2007). Use of spermatozoa as vectors of exogenous dna for in vitro production of bovine transgenic embryos. *Reproduction, Fertility and Development, 19*(1), 320-321.

Vasicek, D., Vasickova, K., Parkanyi, V., Rafay, J., & Ondruska, L. (2010). Effective generation of genetically modified rabbits by sperm mediated gene transfer. *World Rabbit Science, 15*(3), p. 161-166 .

Wang, H. J., Lin, A. X., & Chen, Y. F. (2003). Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. *Animal Biotechnology, 14*(2), 155-165 .

Wu, Y., Liu, C. J., Wan, P. C., Hao, Z. D., & Zeng, S. M. (2009). Factors affecting the efficiency of producing porcine embryos expressing enhanced green fluorescence protein by ICSI-mediated gene transfer method. *Animal Reproduction Science, 113*(1-4), 156-166

Zelphati, O., & F C Szoka, J. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *PNAS, 93*(21), 11493-11498 .

Zhao, Y., Yu, M., Wang, L., Li, Y., Fan, J., Yang, Q., & Jin, Y. (2012). Spontaneous uptake of exogenous DNA by goat spermatozoa and selection of donor bucks for sperm-mediated gene transfer. *Molecular Biology Reports., 39*(3), 2659-2664 .

www.SID.ir

Archive of SID
Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**

DOI: 10.22055/ivj.2019.184521.2134

Effects of sperm parameters and incubation conditions of sperms with foreign DNA in ovine sperm transfection

Khosro Hoseini Pajooh[1*] and Parviz Tajik[2]

[1] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran-Iran

[2] Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 06.05.2019 Accepted: 27.11.2019

Abstract

Sperm-mediated gene transfer (SMGT) based on the intrinsic ability of sperms to bind and take-up of exogenous DNA was introduced in 1989. From that time on, it has been a challenging topic. One of the serious challenges was the motility of transfected sperms and hence their ability to fertilize the oocyte. The present study aimed to determine the effects of media and incubation conditions and also sperm parameters on the transfection of ovine spermatozoa by foreign DNA. In this study, the effects of various incubation temperature (5, 20 and 37 ºC), three different media (PBS, TCM and DMEM), presence of FBS in medium, viability and motility of sperms and sperm capacitation in DNA absorption rate and intensity were assessed by using rhodamine-labeled EGFP plasmid. Results showed that incubation of spermatozoa with plasmid in 37ºC leads to more transfection rate but various incubation media and presence or absence of FBS had no significant effect on DNA uptake rate and intensity. Motility rate and capacitation of sperms had no significant effects too. However, in sperms with a damaged membrane, the DNA uptake rate increased significantly. All of the spermatozoa with true DNA absorption (post acrosome absorption) were immotile and none of the examined treatments in this study could produce motile transfected spermatozoa. Regarding the results of this study, it seems that membrane-damaged spermatozoa incubated with foreign DNA can be used for SMGT-ICSI to produce transgenic animals.

Key words: Ovine, SMGT, sperm, transfection, incubation conditions

[*] **Corresponding Author**: Khosro Hoseini Pajooh, Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran-Iran, Iran, E-mail: pajooh@irost.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir