Archive of SID

همایش محصولات تراریخته درخدمت تولید غذای سالم، حفاظت از محیط زیست و توسعه پایدار

دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان- ۴ آذر ۱۳۹۵

روش‌های انتقال ژن به عنوان یکی از امکانات بیوتکنولوژی نوین در تولید حیوانات تراریخته گامی به جلو در دست یابی به امنیت غذایی و توسعه پایدار

امین دیندار[1*]، مریم کرمی[2]، آرش جوانمرد[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

۲- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشگاه رامین خوزستان

۳- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*Email:Amin.dindar@gmail.com

چکیده

از تکنولوژی انتقال ژن های مورد نظر به ارگانیسم های دیگر در تولید مواد غذایی در زمینه های مختلف کشاورزی، اصلاح نژاد برای انتخاب حیوانات اهلی بر پایه مشخصات مطلوب آن ها استفاده می شود. روش انتقال ژن ها و یا تغییر اطلاعات ژنتیکی به وسیله تغییر ترکیب DNA، اصلاح ژنتیکی نامیده می شود. حیوانات را می توان به وسیله مهندسی ژنتیک اصلاح نمود. لازم است که ژن ها در مرحله ای از گسترش(تکامل) که در تمام سلول های بالغ موجود بوده و به نتاج منتقل می شوند، استفاده شوند. DNA را می توان داخل تخم تازه از طریق پیپت شیشه ای ریز تزریق کرده و با تزریق مقدار خیلی کم به تخم، ژن های جدیدی به دست آورد. تخم های تزریق شده با DNA برای پرورش به رحم مادر مناسب انتقال می یابند. با استفاده از این روش، کارهای زیادی بر روی حیوانات مختلف از جمله گاو، خوک، گوسفند و بز انجام شده است. با استفاده از تزریق به مقدار یک میلیونیم DNA می توان ژن های جدیدی به تخم های ماهی وارد کرد ولی این روش برای تخم پرندگان مناسب نیست. با استفاده از ویروس های اصلاح شده ویژه نیز می توان ژن های جدید به داخل سلول ها وارد نمود. از این روش برای تولید جوجه های مقاوم به بیماری ها استفاده کرد. این ویروس های مصنوعی بی ضرر بوده و از طریق پوسته تخم مرغ وارد می گردند. بیوتکنولوژیست ها با دستکاری های بدون ضرر در ژن های حیواناتی مانند گوسفند، گاو و ماهی باعث رشد سریع آن ها می شوند. هم چنین با دستکاری ژنتیکی می توان به گوشت کم چربی و ترد دست یافت که ارزش غذایی و سلامت بخشی آن بسیار بالا باشد. تکنولوژی دستکاری ژنتیکی در آینده نزدیک سبب تغییرات اساسی در ساختار رشته های پزشکی، علوم دامی، دامپزشکی، غذا و دارو و انرژی که همواره در حال افزایش قیمت و کمیاب شدن است تأمین کند. بی شک تکنولوژی دستکاری ژنتیکی نقش بزرگ و مهمی در پیشرفت های صنعتی آینده خواهد داشت.

کلمات کلیدی:انتقال ژن، مهندسی ژنتیک، حیوانات تراریخته، دستکاری ژنتیکی، ارزش غذایی

۱–مقدمه

محصولات نوترکیب که با اصلاح ژنتیکی و تغییر در DNA موجودات مختلف تولید می شوند موجب تحول عظیمی در تنوع فرآورده های دارویی پرمصرف و ارزشمند شده اند. استفاده از باکتری اشریشیاکلی در اوایل دهه۸۰، روش غالب برای تولید برخی

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات دارویی بود اما پس از پیچیده تر شدن ژن ها، سیستم کشت بافت های جانوری مورد استفاده قرار گرفت. هزینه تولید هر گرم پروتئین نوترکیب برای داروها از طریق کشت بافت بسیار زیاد می باشد به همین دلیل لزوم توسعه روشی ارزان تر مورد توجه قرار گرفته است. این روش جایگزین، استفاده از حیوانات تراریخته است(۶). با تشخیص پیشبرنده هایی(Promoter) در اندام های ترشحی جاندار که فرآورده تولیدی را می تواند به سمت مایعات بدن مثل خون، شیر، لنف و یا بزاق هدایت دهد با یک راکتور زیستی مثل بز(شکل ۱) و موش(شکل ۲)، بهای فرآورده تولید شده کمتراز کشت بافت و خیلی نزدیک به قیمت ماده تولید شده در اشریشیاکلی و مخمر است. DNA ساختمان بدن موجودات زنده در طول زندگی یکسان است و کدهای ژنتیکی هر موجود زنده حالت کلی دارد. با استفاده از تکنولوژی انتقال ژن های مورد نظر به ارگانیسم های دیگر اصلاح ژنتیکی برای انتخاب حیوانات اهلی بر پایه مشخصات مطلوب آن ها صورت می گیرد. افزودن اطلاعات ژنتیکی خارجی به ژنوم یک موجود زنده و تولید پروتئینی با عملکرد فیزیولوژیکی خاص، سرکوب کردن یک ژن داخلی و تولید داروهای زیستی از اهداف انتقال ژن است. بهبود صفات مختلف حیوانات با انتقال ژن های مطلوب صورت می گیرد ازآن جمله تغییر ترکیبات شیر گاو مثل حذف لاکتوز، خوک های ترانسژنیک دارای ژن فیتاز، گاوهای ترانسژنیک دارای ژن لایزوستافین و بتا و کاپاکازئین ، بزهای ترانسژنیک دارای ژن لایزوزیم و گوسفندان دارای پشم شسته بیش از ۶٪ را می توان برشمرد. هدف از انجام این پژوهش بررسی روش های انتقال ژن به عنوان یکی از ابزارهای جعبه ابزار مهندسی ژنتیک در تولید حیوانات تراریخته می باشد(۱).

۲-نتایج و بحث

۲-۱ پیشرفت در صنعت از طریق انتقال ژن و تولید جانوران تراریخته:

حیوانات تراریخته مدل‌های خوبی برای مطالعه مکانسیم های بنیادی هستند که ژن ها به وسیله آنها فیزیولوژی بدن حیوان را کنترل می کند. وارد شدن یک توالی DNA خارجی به ژنوم یک موجود زنده چند سلولی به طوری که در اغلب سلول های آن حضور داشته و به نسل بعد منتقل شود. در گذشته از اصطلاح GMO و سپس از اصطلاح GMP وGMA به ترتیب برای گیاهان و جانوران استفده می شد. Gordon (۱۹۸۰) برای اولین بار از کلمه Transgenic استفاده کرد. با این روش، متخصصان زیست شناسی مولکولی می توانند به بررسی توالی های ژنی موجود و ارزیابی اثرات جهش در حیوان بپردازند. از سیستم موش تراریخته به عنوان مدل برای مطالعه بیماری های ژنتیکی در انسان استفاده می شود، و دام های تراریخته مانند گوسفند، بز، خوک و گاو نیز برای این منظور تولید شده اند. در سال های اخیر، استفاده از این حیوانات به عنوان واکنشگرهای زنده برای تولید پروتئین های دارویی نوترکیب به ویژه آن هایی که از طریق میکروارگانسیم های نوترکیب به گونه ای رضایت بخش تولید نمی شوند مورد استفاده وسیعی قرار گرفته اند. تاکنون پروتئین آلفا-۱- آنتی‌تریپسین (در بیماری‌های ژنتیکی)، آنتی هموفیلیک- فاکتورهای IX و VIIIخونی (در بیماری‌های ارثی و مادرزادی انعقاد خون)، پروتئین C در بیماری‌های روماتیسم(التهاب و تورم حاد مفصلی)، آنتی ترومبین III (در بیماری‌های انعقاد خون و سقط جنین) و هورمون‌های رشد انسانی از طریق این تکنولوژی تولید شده اند(۷).

روش‌های انتقال ژن شامل تزریق به پیش هسته(۲)، انتقال هسته سلول های بدنی(۸)، انتقال از طریق ویروس ها(۱۱)، انتقال از طریق اسپرم، انتقال از طریق بیضه، انتقال از طریق سلول های بنیادی جنینی(۹)، انتقال از طریق ترانسفکشن سلول های

www.SID.ir

Archive of SID

بلاستودرم جنین تخم مرغ و با استفاده از روش In ovo injection (۲)را می توان برشمرد. هر کدام از این روش ها دارای مزایا و معایب می باشند.

تزریق به داخل پیش هسته: در این روش به تکنیک هایی نظیر IVM نیاز است. مشکل رؤیت پیش هسته در گوسفند و بز و تیرگی سیتوپلاسم در گاو و بازدهی بسیار کم از مشخصه های این روش است. فراسنجه های مؤثر در بازدهی این تکنیک شامل فورولاسیون بافر تزریق شده، شکل DNA (خطی یا حلقوی)، محل تزریق(پیش هسته یا سیتوپلاسم)، غلظت DNA (ترانس ژن) و اندازه ترانس ژن می باشد. در این روش زمان ایجاد غشای پیش هسته مشخص کننده زمان تزریق بوده و در گونه های مختلف متفاوت است. برای ورود ترانس ژن به ژنوم میزبان لازم است ترانس ژن قبل از مرحله سنتز(S) در پیش هسته حضور داشته باشد تا طی مراحل همانند سازی DNA وارد ژنوم میزبان شود. مهم ترین مشکل این تکنیک ۹۰٪ از جنین های شکل گرفته فاقد ترانس ژن موردنظر می باشد و نرخ موزاییک بالاست(۲).

جهت شناسایی نوزاد تراریخته از تکنیک های مختلفی از جمله PCR که ورود ترانس ژن به صورت اپی زوم را نشان می دهد. روش دیگر FISH است که محل دقیق ورود ترانس ژن به کروموزوم ها را مشخص می کند. از تکنیک RTPCR برای اندازه گیری میزان بیان ژن جهت تشخیص انتقال موفق ژن استفاده می شود. با افزایش زمان، کاهش میزان بیان ژن هایی که به صورت اپی زوم وارد شده اند رخ می دهد. همچنین از نشانگرها(ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک خاصی و یا نشانگرهای ایجاد کننده نورفلئورسنت مثلGFP در شناسایی موجود تراریخته استفاده می شود. مشکل ورود تصادفی ترانس ژن به ژنوم میزبان با افزودن توالی های مشابه با ژن هدف به ابتدا و انتهای ترانس ژن صورت می گیرد(۱۰)

روش EX VIVO: ترکیب سلول های بیضه با ترانس ژن و تزریق آن به داخل بیضه حیوان دیگر صورت می گیرد. سلول های بیضه در روز ۴-۵ انکوباسیون تخم مرغ و از داخل رگ های خونی و در زمان مهاجرت این سلول ها از هلال جرمینال به جریان خون و سپس حرکت آنها به سمت گنادها قابل اخذ می باشد. در همه روش های انتقال ژن از طریق بیضه، سلول های تولید کننده اسپرم با ژن مورد نظر ترانسفکت شده و در زمان انزال اسپرم توسط حیوان نر به داخل مجاری تناسلی حیوان ماده وارد می شود. پس از آمیزش و باروری تخمک به واسطه اسپرم های ترانسفکت شده و یا استفاده از این اسپرم ها برای باروری تخمک تحت شرایط آزمایشگاهی(IVF)، امکان ایجاد جنین های تراریخت فراهم می شود. این روش ها نیاز به جمع آوری و دستکاری یا انتقال تخم ها را برطرف می سازد(۹).

انتقال هسته سلول های بدنی: در این تکنیک انتقال هسته از یک سلول دهنده به یک سلول گیرنده(تخمک) فاقد کروموزوم می باشد. در این روش ابتدا می توان تغییرات ژنتیکی در سلول های کشت داده شده را با استفاده از روش های مختلف ترانس فکشن نظیر لیوفکشن و الکتروپوریشن انجام و سپس با انتقال آن ها به تخمک های بالغ حیوان تراریخته را ایجاد کرد. در این روش سلول هایی گزینش می شوند که ژن مورد نظر را درسطح خاصی بیان کنند. ممانعت از ایجاد حیوانات موزاییک در این تکنیک مشهود است. نوع سلول دهنده هسته اثر چشمگیری بر توان کلی تولید بلاستوسیت ندارد(۸).

حامل‌های ویروسی: استفاده از رتروویروس‌ها، لنتی ویروس ها و آدنو ویروس ها که به طور پایداری وارد ژنوم سلول میزبان می شوند تکنیک های دیگر انتقال ژن هستند. RNA ویروس پس از ورود به داخل سلول میزبان بهDNA تبدیل و به ژنوم میزبان

www.SID.ir

Archive of SID

وارد می شود. از مشخصه های استفاده از حامل های ویروسی، محدودیت در اندازه، ترانس ژن مورد استفاده، نرخ مرگ و میر بالای جنین ها، ایجاد موزاییک، امکان ایجاد آلودگی توسط این ویروس ها و امکان عدم انتقال ترانس ژن به نسل بعد است(۱۱).

در یکی از تحقیقات ابتدا اسپرم را منجمد سپس ذوب کرده و در معرض دترجنت تریتون قرار دادند. نفوذپذیری غشای سلولی اسپرم ها تغییر کرده و ترانس فکت اسپرماتوزا صورت گرفت. سپس اسپرم ها به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق شد و تعداد زیادی حیوان تراریخته ایجاد شد. نتایج تحیقیقات نشان می دهد که افزایش تعداد کپی های ترانس ژن در هر اسپرم باعث فعال شدن اندونوکلئازهای داخل اسپرم شد که منجر به شکستن ترانس ژن و برخی نواحی ژنوم میزبان شده و به دنبال آن مرگ اسپرم های ترانس فکت شده خواهد شد(۱۸). نتایج تحیقات دیگر نشان داد که تأثیر توالی ترانس ژن بر بازدهی تران فکشن اسپرم غیرمعنی دار بوده است. نوع راه انداز و تسریع کننده بر بازدهی انتقال ژن از طریق اسپرم مؤثر بوده در حالی که نوع و اندازه ترانس ژن از اهمیت چندانی برخوردار نبوده است. علاوه بر تفاوت های بین گونه ای، از طریق عوامل بسیار مؤثر در این زمینه متفاوت بودن نسبت اسپرم به ترانس ژن و نیز حجم محیط انکوباسیون اسپرم و ترانس ژن است که افزایش حجم محیط انکوباسیون بر تعداد کپی های ترانس ژن وارد شده به داخل اسپرم به شدت مؤثر بوده است. برای افزایش بازدهی ترانس فکشن اسپرم از تکنیک های مختلفی نظیر لیپوفکشن، الکتروپوریشن، تزریق حامل های ویروسی به داخل سیتوپلاسم تخمک، ترانس فکشن اسپرم با استفاده از حامل های ویروسی، تزریق ترانس پوزان ها به داخل سیتوپلاسم تخمک و تزریق آنزیم Recombinase به داخل سیتوپلاسم تخمک استفاده شده است(۱۳). LB-SMGT: در این تکنیک یک آنتی بادی تک بیان ویژه در سطح اسپرم با DNA کمپلکس تشکیل می دهد. DNA متصل شده به آنتی بادی توانایی واردشدن کمپلکس تشکیل شده را از طریق آندوسیتوز به واسطه گیرنده ارائه می دهد(در موش و خوک استفاده می شود)(۹).

ترشحات کیسه سیمنتال و دیگرغدد ضمیمه دارای خاصیت DNAse بسیار قوی بوده که از دیگر عوامل ممانعت کننده انتقال ژن از طریق اسپرم محسوب می شوند. افزودن EDTA یا حرارت دادن ترشحات غدد ضمیمه باعث حذف خاصیت DNAse آن ها می شود. برای حذف این ممانعت کننده ها، شستشوی کامل اسپرم یک مرحله ضروری است(۳).

انتقال ژن با استفاده از سلول های پایه رویانی: سلو های پایه سلول های تمایز نیافته ای هستند که قابلیت تبدیل شدن به هر نوع سلول(سلول سوماتیک یا سلول زاینده) را دارند. رویان ها در مرحله بلاستوسیت دارای چندین سلول هستند و می توان آن ها را جدا و تکثیر نمود. در این روش سلول های پایه رویانی را در شرایط برون تنی تکثیر کرده و ژن مورد نظر را به ساختار DNA آن ها انتقال داد. سپس سلول های پایه رویانی را به درون حفره بلاستوسیت یک رویان تزریق می کنند. بعد از مدتی سلول های پایه رویانی بخشی از توده سلولی درونی رویان می شوند. با انتقال چنین رویان هایی به رحم حیوانات گیرنده می توان منتظر متولد شدن حیوانات تراریخته بود. این حیوانات نیز از نوع کایمریک هستند(۲).

نوکلئوفکشن: یک روش توأم مکانیکی و شیمیایی(الکتروپوریشن و نیز محیط مناسب برای ترانسفکشن سلول ها) انتقال ژن از طریق وابسته به مرحله همانند سازی نبوده و برای سلول های در حال تقسیم و یا غیر آن کاربرد دارد(۵و۴).

www.SID.ir

Archive of SID

۳–نتیجه‌گیری کلی

با پیشرفت علم در زمینه های زیست شناسی مولکولی، تولید حیواناتی که ژن های خارجی را در ژنوم خود حمل می کنند امکانپذیر شده است. این ژن خارجی را ترنس ژن(Transgene) و حیوان مورد نظر را تراریخته (Transgenic) می نامند. این تکنیک ابتدا در مورد موش سپس در دیگر پستانداران به کار برده شد و تکنیک مؤثری در پژوهش های زیست شناسی و پزشکی است و می تواند کاربردهای تجارتی و عملی مثل تولید پروتئین های نوترکیب دارویی را داشته باشد.

۴–پیشنهادات

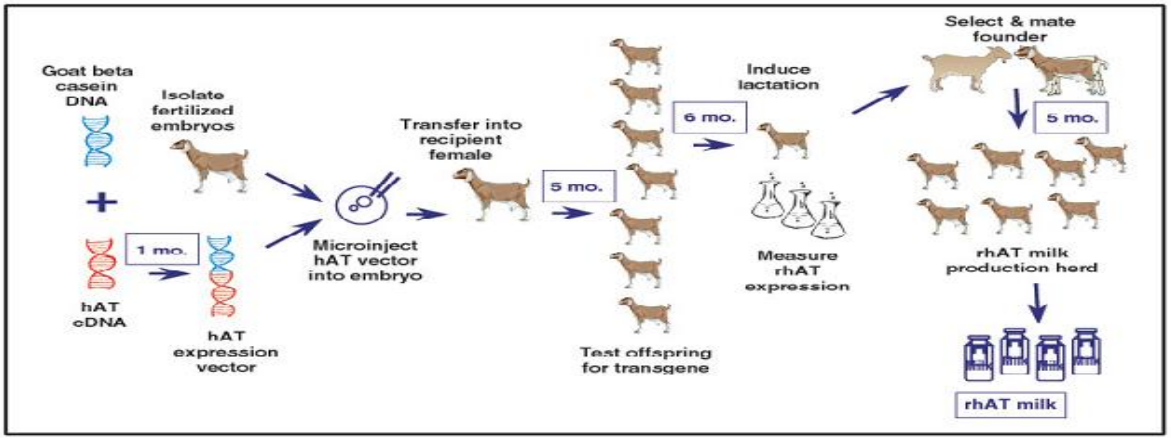
با نگاه به آینده اقتصادی جهان انتظار می رود که تکنولوژی تولید موجودات تراریخته به عنوان بخشی از تکنولوزی نسل جدید ویژگی صنعتی قرن بیست و یکم باشد. باید قبول کرد که بیوتکنولوژی ریشه در تاریخ گذشته دارد و به طور موفقیت آمیزی در صنعت ادغام شده که باید عموم مردم را با این موضوع آشنا کرد. بی تردید مهم ترین دلیلی تسلط بیوتکنولوژی باید ناشی از مزیت استفاده سریع آن از زیست شناسی مولکولی باشد به ویژه از نظر تکنولوژی DNA نوترکیب که باعث تسلط انسان به طبیعت بر طبیعت می گردد و امکان آن را فراهم می آورد که به طور مستقیم ماده وراثت پذیر DNA را در سلول های گوناگون در انواع مختلفی از موجودات زنده به وجود آورده شود. عوامل محدود کننده فراوانی همانند توده ژن ها و انتخاب آن ها این عمل را مشکل می کنند و بیشترین عامل محدودکننده در استفاده از مهندسی ژنتیک در اثر کمبود اطلاعات ژنتیکی و ساختار عمل ژن هاست.

۵–قدردانی

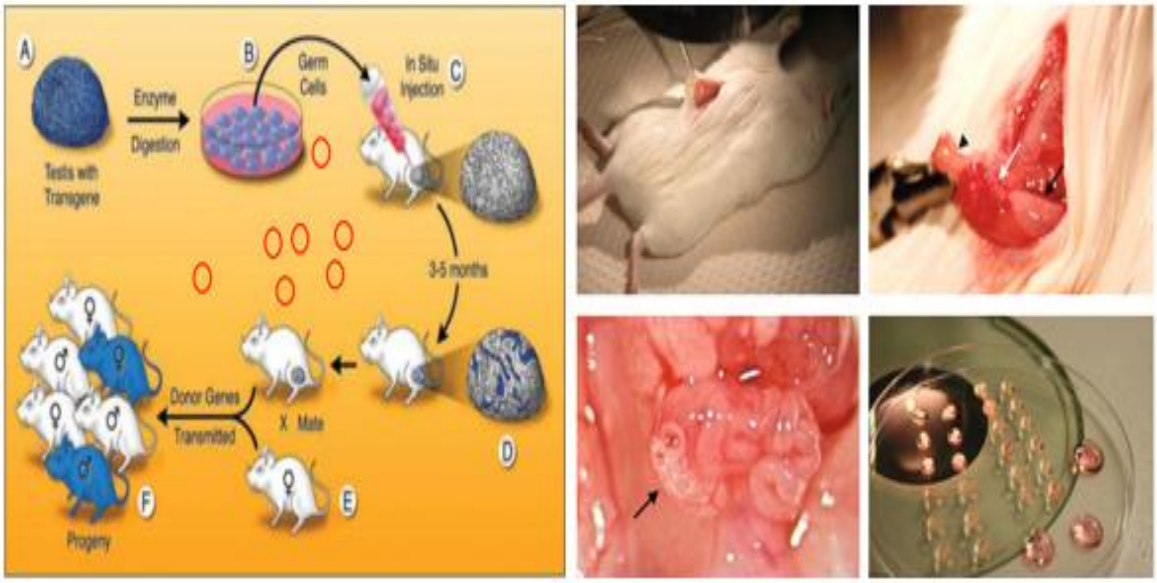
بدین وسیله از مساعدت ها و همکاری علمی جناب آقای دکتر محمود نظری هیئت علمی دانشگاه رامین خوزستان صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- نحوه تولید بز تراریخته به عنوان رآکتور زیستی



شکل۲- استفاده از موش به عنوان موجود مورد دستورزی ژنتیکی جهت تولید حیوان تراریخته برای اهداف تولید سرم و دارو

۶- منابع

۱. ناظرعدل، کامبیز و دوست بهروزی، سعید؛ بیوتکنولوژی در دامپروری و تغذیه دام و طیور، انتشارات چهر، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، ۱۳۸۷.

2. Brinster, R. (1974). The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. J. Exp. Med.:1049-1056.
3. Church GM. Genomes for all. Sci Am 2006;294(1):46-54.
4. Daneshpour MS, Rebai A, Houshmand M, Alfadhli S, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, Azizi F. 8q24.3 and 11q25 chromosomal loci association with low HDL-C in metabolic syndrome. Eur J Clin Invest 2011; 41(10): 1105-12.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA,Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA,Shojaei S, Zarkesh M, Azizi F. Haplotype Analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran Lipid Glucose Study Endocrine 2012; 41(1): 103-10 .
6. Donnelly, S., McCarthy, C.R. and Singleton, R. Jr. (1994). The Brave new World of Animal Biotechnology, Special Supplement, Hastings Center Report.
7. Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) September 1992, revised February 1995. Transgenic Animals - Derivation, Welfare, Use and Protection.
8. Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1981). Integration and stable germ line transformation of genes injected into mouse pronuclei. Science 214:1244-1246
9. Gossler, A. et al. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9065-9069.
10. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. J Exp Biol 2007; 210(Pt 9): 1518-25.
11. Hanna, G. J., V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, J. Martinez- Picado, L. Sutton, J. D. Hazelwood, and R. T. D'Aquila.2000. Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. J. Clin. Microbiol.38:2715–272.
12. Hertogs, K., M. P. de Bethune, V. Miller, T. Ivens, P. Schel, A. Van Cauwenberge, C. Van Den Eynde, V. Van Gerwen, H. Azijn, M. Van Houtte, F.Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp, B. Larder, and R.Pauwels.1998. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. Antimicrob. Agents Chemother.42:269–276.
13. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat Methods 2008; 5(1): 16-8.

www.SID.ir