فرزاد غفوری[۱*]، کریم حسن‌پور[۲]
[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
[۲] استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
farzad.ghafouri@ut.ac.ir

بررسی علم بیوتکنولوژی و روش‌های ایجاد حیوانات ترانس‌ژنیک

Study on the Science of Biotechnology and the Methods of Creating Transgenic Animals

چکیده

حیوان واجد ژن بیگانه (ترانس ژن)، علاوه بر ماده ژنتیکی خود، مقداری ماده ژنتیکی اضافی با منشاء خارجی را نیز دارا است. برای دستیابی به هدف‌های مورد نظر در ایجاد این حیوانات، جانور ترانس ژنیک باید توانایی انتقال ترانس ژن به نسل‌های آینده را دارا باشد؛ از این رو، ترانس ژن باید در دودمان‌های سلول‌های جنسی نیز وارد شود. در عملیات ترانس‌ژنزیس (فنون مربوط به تولید حیوانات ترانس ژنیک) و به دلایل متعدد، پژوهشگران، بیشتر از دو گونه سلولی استفاده می‌کنند: اووسیت لقاح یافته و سلول‌های پایه‌ای جنینی. اولین جاندار تراریخته در سال ۱۹۷۳ توسط استنلی کوهن و هربرت بویر ایجاد شد. واژهٔ حیوان تراریخته اولین بار توسط گاردن و ردل در سال ۱۹۸۰ به کار برده شد. این اصطلاح اشاره به انواع خاصی از موجودات پرسلولی دارد که ساختار ژنتیکی آن‌ها با وارد شدن ژن های بیگانه از سایر گونه‌ها بدون استفاده از روش تولیدمثل طبیعی حیوان و عمدتاً از طریق روش‌های آزمایشگاهی دچار تغییر شده است، این حیوانات حامل یک قطعه ژنوم بیگانه که وارد ژنوم آن‌ها شده و مطابق قوانین مندلی به ارث می‌رسد، هست. در این روش از سلول‌های پایه‌ای جنینی مهندسی شده استفاده می‌کنند. این سلول‌ها به سهولت در محیط کشت، رشد می‌کنند و پژوهشگران قادراند که به راحتی سلول‌های پایه‌ای جنینی را مورد دستکاری ژنتیکی قرار دهند و سپس به کمک ژن‌های نشانگر انتخابی، سلول‌های مورد نظر را گزینش کرده و آن‌ها را در یک بلاستوسیت گیرنده تزریق کنند و بلاستوسیت حاصل را در رحم مادر پرورش دهنده بکارند تا حیوان ترانس‌ژنیک ایجاد شود. نخستین تجربه از نوع تزریق داخل سیتوپلاسمی، با استفاده از ژن رمزکننده پروتئین فلوئورسنت سبز انجام گرفت. زمانی که این ژن در این بافت بیان شود بافت در زیر پرتو UV، پرتو سبز ساطع می‌کند. با این روش مناسب، بیان یا عدم بیان ترانس ژن را می‌توان مشخص کرد.

واژه‌های کلیدی: بیوتکنولوژی، ترانس‌ژن، سلول‌های جنسی، حیوانات ترانس‌ژنیک، ژنوم بیگانه و نشانگر انتخابی

مقدمه

ژنتیک کمی در طی دوران متوالی دو دهه اخیر شگفتی‌های بسیاری آفرید که حاصل همکاری دو علم ژنتیک مولکولی و آمار ریاضی بوده است. در طی ۲۰-۲۵ سال اخیر با توسعه مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، بیوتکنولوژی مدرن توانست پیشرفت‌های بسیاری در علم بیولوژی ایجاد کند که بخشی از این تکنیک‌ها را می‌توان در توسعه صنعت دامپروری مشاهده کرد. تکنیک‌های بیولوژی مدرن مانند کلونینگ مولکولی ژن‌ها، انتقال ژن، دستکاری ژنتیکی حیوانات، انتقال جنین، دستکاری ژنتیکی میکروب‌های شکمبه، تیمار بیولوژیکی و شیمیایی خوراک‌های کم کیفیت حیوانی در جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای، روش‌های افزایش سیستم ایمنی و تهیه واکسن‌های دامپزشکی بخشی از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشند که در جهت افزایش تولید محصولات کشاورزی و حفاظت از محیط زیست به‌کار گرفته می‌شوند. با بیان بسیار ساده و جامع، بیوتکنولوژی یک سری تکنیک‌های قدرتمندی است که دستکاری موجودات زنده و یا اجزای سلولی آن‌ها برای تولید محصولات، ایجاد فرایندها و یا ارائه خدمات به‌کار گرفته می‌شود. تمامیت و توان این تعریف در این است که کلیه فعالیت‌های بیولوژی مولکولی، کشاورزی، تهیه واکسن، کنترل آلودگی‌ها، مهندسی شیمی و بسیاری از صنایع را در بر می‌گیرد. ژنتیک کمی در طی سه دهه اخیر شگفتی‌های بسیاری آفرید که حاصل همکاری دو علم ژنتیک مولکولی و آمار بوده است. بیوتکنولوژی مدرن توانسته است پیشرفت‌های بسیاری در علم بیولوژی ایجاد نماید که بخشی از این تکنیک‌ها را می‌توان در توسعه صنعت دامپروری مورد استفاده قرار داد. در این مقاله تمرکز بر این است که بیوتکنولوژی مدرن، با کاربردهای وسیع آن در پیشرفت ژنتیکی حیوانات اهلی معرفی گردد. لذا با مطرح کردن تاریخچه بیوتکنولوژی، بیان دو روش جدید از روش‌های ایجاد حیوانات ترانسژنیک و نیز خطرات احتمالی این حرفه، سعی بر این است که این علم در همه‌ی زمینه‌ها به‌خصوص در حوضه دامی به پژوهشگران معرفی گردد.

در خلال دهه‌ی ۱۹۷۰، اولین موش‌های مهندسی ژنیک شده ایجاد شدند. بدین منظور سلول‌های دو جنین متعلق به دو نژاد مختلف موش با یکدیگر مجاور شدند و جنینی واحد شکل گرفت که پس از رشد در بدن یک مادر پرورش‌دهنده، موشی که به دنیا آمد، نشان و ویژگی‌هایی از هر دو والد داشت. با پیشرفت سریع قلمروهای مختلف زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و از جمله درک بیشتر ارتباط متقابل زیست‌شناسی رشدو نمو و روش‌های مهندسی ژنتیک، بستر مناسب برای رشد سریع و ابداع روش‌ها و فنون ایجاد حیوان ترانس ژنیک فراهم آمد.

گردون و همکاران (۱۹۸۱) برای اولین بار با استفاده از روش ریز تزریق DNA، ژنی بیگانه را به درون ژنوم موش وارد کردند، بدین ترتیب، نخستین پستاندار ترانس ژنیک شکل گرفت. پس از آن، این روش برای تولید شمار فراوانی از دیگر حیوانات ترانس ژنیک مانند خرگوش، گوسفند و خوک مورد استفاده قرار گرفت. طبیعتا این روش‌ها و فنون نیز توسعه‌ی فراوانی یافت و به طور مشخص و بدین منظور فنون متعدد دیگری نیز ابداع گردید و مورد استفاده قرار گرفت. با این همه بیشتر مطالعات ترانس ژنیک روی موش انجام گرفته است. این امر دلایل متعددی به‌ویژه موارد زیر دارد:

۱- کوچک بودن جثه، هزینه‌های کم و سهولت نگهداری در محیط آزمایشگاه در مقایسه با عموم پستانداران

۲- قدرت تولیدمثل سریع (زمان بارداری موش در حدود سه هفته است).

۳- هم‌ساختی بسیار بالای ژنوم موش با ژنوم انسان

۴- دستاوردهای فراوان و رو به رشد در زمینه‌هایی مانند ژنتیک، فیزیولوژی، جنین‌شناسی، ایمنی‌شناسی و بیوشیمی موش

در سال ۱۹۹۷ و در پی کلون‌سازی موفق یک پستاندار، امکان ادغام فنون مربوط به ترانس ژنزیس و کلون‌سازی مهیا گردید.

موجودی که محتوای ژنتیکی آن با افزودن DNA خارجی تغییر یافته باشد، ترانس ژنتیک نامیده می‌شود. DNA خارجی را ترانس ژن می‌نامند و به کل فرآیند تکنولوژی ترانس ژنیک اطلاق می‌گردد. یکی از اهداف انتقال ژن در گاوهای شیری تغییر ترکیبات شیر است. به علت اینکه راندمان تولید پنیر از شیر رابطه‌ی مستقیمی با مقدار K-Casein شیر دارد، پس افزایش تولید کاپاکازئین در شیر با استفاده از انتقال ژن تغییر شکل یافته کاپاکازئین یک روش منطقی برای افزایش تولید پنیر می‌باشد. یک مثال دیگر در مورد شیر، تولید شیرهای عاری از لاکتوز (قند شیر) می‌باشد. برخی افراد (بخصوص سیاه پوستان) حساسیت خاصی به لاکتوز موجود در شیر دارند. بنابراین نمی‌توانند شیر مصرف کنند. ولی شیر بدون لاکتوز که از دام‌های ترانس ژنیک تولید می‌گردد برای این گونه افراد مشکلی به وجود نمی‌آورد. مثال دیگر در این مورد تولید انسولین با به‌کارگیری گاوهای ترانس ژنیک هست.

در کل در مورد حیوانات اهلی سعی بر این است که دام‌هایی تولید کنند تا مقاومت قابل توارثی برای بیماری‌های انگلی، ویروسی و باکتریایی داشته باشند. مقاومت به بیماری باکتریایی ورم‌پستان در گاو، اسهال نوزادان در خوک و وبای مرغی در طیور از این قبیل می‌باشند. اگر اساس هر کدام از این مقاومت‌ها یک ژن ساده باشد می‌توان حیوانات ترانس ژنیکی تولید کرد که به آلودگی‌های باکتریایی مقاوم باشند. در واقع اساس تولید حیوانات مقاوم به بیماری‌های توارثی انتقال ژن می‌باشد و در حال حاضر برخی از ژن‌های کاندیدا مثل MHC، T-Cell Receptors و Lymphokine در این راستا مطالعه می‌شوند. مرغ‌های انتقال ژن یافته می‌توانند در جهت ایجاد سویه‌های مقاوم به بیماری‌های کوکسیدی و ویروسی به‌کار گرفته شوند و یا برای راندمان بهتر خوراک، چربی کمتر لاشه، میزان پایین کلسترول در تخم‌مرغ و کیفیت بهتر گوشت انتقال ژن داده شوند.

روش سلول‌های پایه‌ای جنینی مهندسی شده

از آنجا که دو روش پیشین، معایبی دارند که الحاق کاملاً تصادفی ترانس ژن در ژنوم سلول که می‌تواند موجب از کار افتادن ژن‌های اصلی موجود و ایجاد اختلالاتی در حیوان گردد؛ از مهم‌ترین آن‌ها به‌حساب می‌آید.

دانشمندان به فکر استفاده از روشی افتادند که آن‌ها را قادر سازد تا بتوانند ترانس ژن را به‌طور دقیق در هر محلی که مورد نظر آن‌ها است، وارد کنند. این مکان‌ها، معمولاً در ژن یا محلی از ژنوم قرار دارد که الحاق ترانس ژن، تغییر قابل‌توجهی در عملکرد ژن‌ها یا موجود ایجاد نکند. در این روش از سلول‌های پایه‌ای جنینی مهندسی‌شده (Engineered Embryonic Stem Cells) استفاده می‌کنند.

این سلول‌ها به سهولت در محیط کشت، رشد می‌کنند و پژوهشگران قادرند که به‌راحتی سلول‌های پایه‌ای جنینی را مورد دستکاری ژنتیکی قرار دهند و سپس به کمک ژن‌های نشانگر انتخابی (Marker genes)، سلول‌های مدنظر خود را گزینش کرده و آن‌ها را در یک بلاستوسیت گیرنده تزریق کنند و بلاستوسیت حاصل را در رحم مادر پرورش‌دهنده جای دهند تا حیوان ترانس ژنیک ایجاد شود.

طراحی ناقل: در این روش، هدف الحاق ترانس ژن در محل ویژه ای از ژنوم است. بدین منظور ناقلین خاصی را طراحی کرده‌اند که شامل چهار جزء اصلی می‌باشند:

۱- TG: ترانس ژن مورد نظر

۲- HB(Homologous Box): دو ترادف با قسمتی از ژنوم که ترانس ژن در آنجا وارد می‌شود، همساختی دارد. وجود همساختی بین این اماکن و HB، موجبات رخداد کراسینگ اوور و الحاق را فراهم می‌آورد.

۳- Neor: ژن است که موجب مقاومت به آنتی‌بیوتیکی به نام G۴۱۸ می‌شود. این ژن، نوعی نشانگر قابل انتخاب (Selectable marker) محسوب می‌شود.

۴- TK: ژن ایجاد کننده آنزیم تیمیدین کیناز متعلق به ویروس هرپس سیمپلکس (Herpes Simplex Virus)، این آنزیم روی ماده‌ای به نام گانسیکلویر (Gancyclovir) اثر کرده و آن را فسفریله می‌کند. گانسیکلویر فسفریله شده یک ممانعت کننده‌ی DNA پلیمراز به حساب آمده و مرگ سلول را سبب می‌شود. در این ناقل، این ژن نیز نقش نشانگر قابل انتخاب دارد.

ترتیب قرار گرفتن این عناصر در روی ناقل، نقش اساسی در موفقیت این فن دارد. پس از قرار دادن سلول‌های پایه‌ای جنینی در محیط کشت و انجام عمل ترانسفکشن (Transfection) با این ناقل، سه گونه سلول شکل خواهد گرفت:

۱- سلول‌هایی که فاقد ناقل هستند (ناقل وارد آن‌ها نشده است).

۲- سلول‌هایی که ناقل به طور تصادفی وارد ژنوم آن‌ها گردیده است.

۳- سلول‌هایی که ناقل در مکان مورد نظر پژوهشگر، در ژنوم وارد شده است.

طبیعتا تنها سلول‌های نوع سوم، مناسب این فن می‌باشند. از این رو، از سیستم انتخابی موسوم به «سیستم انتخاب مثبت/منفی» استفاده می‌کنند. اگر الحاق تصادفی (بدون استفاده از HBها) انجام گیرد، دو ژن TK نیز در امتداد سایر قسمت‌های ناقل، وارد ژنوم می‌شوند. محیط کشت حاوی گانسیکلویر و G۴۱۸ می‌باشد، بنابراین با وجود ژن‌های TK، گانسیکلویر فسفریله شده و موجب مرگ سلول می‌گردد.

اگر الحاق با کمک کراسینگ‌اوور و قسمت‌های همساخت (HB) انجام گیرد، دو ژن TK حذف شده و تنها ژن‌های TG (ترانس ژن) و Neor باقی می‌مانند. در محیط حاوی گانسیکلویر و G۴۱۸ این سلول ها نمی‌میرند، زیرا Neor موجب مقاومت به G۴۱۸ می‌شود و TK نیز وجود ندارد که روی گانسیکلویر اثر کند؛ بنابراین چنین سلول‌هایی که مورد نظر پژوهشگر هستند، در محیط کشت انتخاب می‌شوند.

تاکید می‌گردد که سلول‌هایی که ناقل را دریافت نکرده‌اند در محیط کشت حاوی G۴۱۸ و گانسیکلویر می‌میرند، زیرا فاقد ژن Neor که موجب مقاومت به G۴۱۸ می‌شود، می‌باشند. پس از انتخاب سلول‌های پایه‌ای مناسب و تزریق آن‌ها به حفره پلاستوسیت گیرنده، سلول‌های حاصل، درون رحم مادر پرورش‌دهنده کاشته می‌شوند تا زاده ایجاد شوند.

تشخیص حیوانات ترانس ژنیک: نظر به اینکه در ایجاد موجود ترانس ژنیک با این روش، دو دسته مختلف سلولی مشارکت دارند، موجود حاصل یک کای‌مرا (Chimera) است. کای‌مرا یا شیمرا به مولکول DNAی نوترکیب واجد ردیف‌های نوکلئوتیدی بیش از یک ارگانیسم اطلاق می‌شود. این نام از افسانه‌های یونانی گرفته شده است که بیانگر بزی است که دارای سر مانند شیر و دمی چون مار (ابلیس) می‌باشد. کای‌مری مناسب است که حاوی ترانس ژن در ردهٔ سلول‌های جنسی خود باشد، یعنی سلول‌های پایه‌ای جنینی که مهندسی ژنتیک شده و حاوی ترانس ژن باشند، در تشکیل رده سلول‌های جنسی سهیم شده باشند تا ترانس ژن بتواند به نسل‌های بعدی انتقال یابد.

برای تشخیص این امر، از رنگ پوشش استفاده می‌کنند. بدین صورت که رنگ پوشش موشی را که دهنده بلاستوسیت است، غالب انتخاب می‌کنند درحالی‌که رنگ پوشش موش گیرنده بلاستوسیت برای کاشت در رحم (بلاستوسیتی که سلول‌های پایه‌ای جنینی به آن تزریق شده است) مغلوب می‌باشد. در نسل اول، زاده کای‌مر فنوتیپ لکه لکه (مخلوطی از دو رنگ) را نشان می‌دهد. از آمیزش این موش کای‌مر با موشی که رنگ پوشش مغلوب دارد و درصورتی‌که ترانس ژن در ردهٔ سلول‌های جنسی نباشد، تمام زاده‌ها رنگ مغلوب خواهند داشت، اما اگر ترانس ژن در رده سلول های جنسی موجود می باشد، بدین معنی است که سلول‌های پایه‌ای جنینی مهندسی شده که طبیعتاً حاوی ژن غالب رنگ پوشش بوده نیز در تشکیل گامت‌ها دخالت داشته‌اند و از این رو احتمال زایش موجوداتی با رنگ غالب نیز وجود دارد که این زاده، در تمام سلول‌های هسته‌دار خود، حاوی حاوی ترانس ژن می‌باشند. روش توصیف شده نیز مانند سایر روش‌های دیگر مزایا و معایبی دارد:ل‌های هسته‌دار خود، حاوی ترانس ژن می‌باشند. روش توصیف شده نیز مانند سایر روش‌های دیگر مزایا و معایبی دارد:

الف) مزایا

۱- سلول‌های پایه‌ای جنینی موش به‌راحتی در محیط کشت رشد یافته و می‌توان دستکاری‌های متنوعی روی آن‌ها انجام داد.

۲- سلول‌های پایه‌ای جنینی مهندسی شده با تغییرات دلخواه را می‌توان انتخاب کرد.

ب) معایب

۱- تاکنون تنها در موش، سلول‌های پایه‌ای جنینی کارایی لازم‌برای این روش را داشته‌اند و در دیگر موجودات امکان دستکاری‌های دلخواه روی پایه‌ای جنینی و ایجاد موجود ترانس ژنیک به این

روش ظاهرا امکان پذیر نبوده است.

۲- موش حاصله، کای‌مر است و امکان دارد ترانس ژن در رده سلول‌های جنسی آن وارد نشده باشد و نیاز به آزمون کردن (آمیزش با موش با رنگ مغلوب) دارد.

روش ادغام اسپرم و استفاده از پروتئین فلورسنت سبز

اخیراً روش‌هایی که پیشتر برای لقاح در خارج از موجود زنده (In Vitro Fertilization) در مورد انسان‌ها به کار می‌رفت، به‌عنوان فنونی بالقوه برای ایجاد حیوان ترانس ژنیک مورد توجه قرار گرفته است. در یکی از اصلی‌ترین این روش‌ها، برای واردکردن ترانس ژن به اووسیت در شرایط In Vitro، از اسپرم به‌عنوان ناقل، استفاده می‌کنند. این روش را تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Intra cytoplasmic Sperm Injection) می‌نامند. نخستین تجربه از این نوع، با استفاده از ژن رمزکننده پروتئین فلورسنت سبز (Green Fluorescent Protein) انجام گرفت. زمانی که این ژن در این بافت بیان شود بافت در زیر پرتو UV، پرتو سبز ساطع می‌کند. با این روش مناسب، بیان یا عدم بیان ترانس ژن را می‌توان مشخص کرد. در این روش، ابتدا اسپرم‌ها در مجاورت غلظت مناسب مواد شوینده (Detergent) قرار می‌گیرند تا غشای اسپرم‌ها نفوذپذیر گردد، سپس با ژن GFP مجاورت داده می‌شود و در پی آن به کمک پیپت‌های ویژه‌ای، اسپرم به اووسیت لقاح نیافته تزریق می‌گردد. پس از سه روز، جنین‌ها به رحم مادر پرورش‌دهنده منتقل می‌شود. زمانی که به موش‌های ترانس ژنیک ایجادشده پرتو UV تابانده شود، پرتو سبز از زیرپوستشان مشاهده می‌شود.

روش مذکور، بسیار جالب به نظر می‌رسد و سیستم کارایی برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک در آینده محسوب می‌گردد. به ویژه که این روش می‌تواند بر شماری از معضلات روش خرد تزریق پیش هسته مانند غیر واضح بودن پیش هسته‌ها در برخی گونه‌ها مانند، گاو، غلبه کند. همچنین به خاطر امکان استفاده از سوزن بزرگ‌تر از آنچه برای خرد تزریق به کار می‌رود، امکان استفاده از ساختارهای خیلی بزرگ‌تری مانند MAC و YACها فراهم خواهد شد. با این همه این روش هنوز در آغاز راه است و کارایی آن برای سایر موجودات (به استثنای موش) باید بررسی شود.

خطرات احتمالی ترانسژنیک

مهندسی ژنتیک شاخه جدیدی از بیوتکنولوژی است و هنوز مسائل زیادی در مورد واکنش LMOها با اکوسیستم‌های مختلف شناخته شناخته شده نیست. بعضی نگرانی‌ها در مورد تکنولوژی‌های جدید شامل احتمال اثرات معکوس این موجودات بر روی تنوع بیولوژیکی و سلامت بشر است.

موارد نگران‌کننده ممکن است تغییرات غیرعمدی در بیماری زایی، قدرت رقابت یا ویژگی‌های دیگرگونه‌های هدف، احتمال تأثیر بر گونه‌های غیر هدف (مانند حشرات سودمند) و اکوسیستم، احتمال تبدیل گیاهان زراعی به علف‌های هرز بر اثر انتقال ژن‌های گیاهان زراعی به انواع وحشی آن و عدم ثبات ژن‌های الحاقی (احتمال اینکه یک ژن اثر خود را از دست بدهد و یا به میزبان دیگری انتقال یابد) باشد.

بنابراین بیوتکنولوژی با افزایش تولید غذا، امنیت غذایی را برای دنیایی که جمعیت آن به‌سرعت در حال گسترش است، تضمین خواهد نمود. این علم با کاهش نیاز به زمینه‌های بیشتر، آبیاری و استفاده از سموم به محیط‌زیست نیز کمک خواهد نمود و همچنین زمینه روش‌های درمانی بهتر و واکسن‌های جدید را فراهم خواهد نمود. هرچند برای بسیاری از مردم، این علم سریع گستر، سوالات زیادی در رابطه با اخلاق، محیط‌زیست، مسائل بهداشتی و اجتماعی به وجود آورده است. آن‌ها می‌گویند بیوتکنولوژی مدرن هنوز آن‌قدر جدید است که مسائل بسیار زیادی درباره تأثیر محصولات آن در محیط‌زیست و در رابطه با گونه‌های دیگر به‌درستی مشخص نیست.

منابع

۱- نوری دلوئی، م.ر.، خسروی نیا، س. و مجید فر، ف. "فرهنگ مهندسی ژنتیک." انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، ایران.

۲- طباطبائی، م.، نوری دلوئی، م.ر. و تقی بیگلو، چ. "بیوتکنولوژی مولکولی." انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، ایران.

۳- نوری دلوئی، م.ر. (۱۳۷۷). "مهندسی ژنتیک، بیوتکنولوژی و جهان اسلام، امید." اولین نشریه علوم پایه پزشکی دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی مشهد، ۶-۷، ۳۱-۳۸.

5-Glick, B.R., Pasternak, J.J., and Patten, C. L. (1994). "Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA." Washington, DC, ASM Press.

6-Strachan, T. and Read, A.P. (2003). "Human Molecular Genetics." Garland science, New York, United States.

7-Kahn, A. (1997). "Clone mammals... Clone man?" *Nature*, (386), 119.

8-Lutz, D. (1997). "Hello, Hello, Dolly, Dolly." *The Sciences*, 37(3), 10-11.

9-Solter, D. (1996). "Lambing by Nuclear Transfer." *Nature*, (380), 24-25.

10- Stewart, C. (1997). "An Udder Way of making Lambs." *Nature*, (385), 769–771.