دامستیک؛ دوره ۲۱، شماره ۱ (شماره ۱۹ پیاپی): ۵۰-۴۳

نشریهٔ علمی- ترویجی (حرفه‌ای)

دامستیک

انجمن علمی- دانشجویی گروه مهندسی علوم دامی دانشگاه تهران؛ بهار ۱۴۰۰

https://domesticsj.ut.ac.ir/article_81666.html

مقاله مروری

روش‌های انتقال ژن و استفاده از سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تولید طیور تراریخته؛ با رویکرد در زمینه‌های ژنتیکی، پزشکی و داروهای زیستی

کاظم رسولی قره‌سقل[۱*]، مهدی ژندی[۲] و فرزاد غفوری[۳]

[۱]کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه مهندسی علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۲]دانشیار فیزیولوژی دام، گروه مهندسی علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۳]دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

https://doi.org/10.22059/domesticsj.2021.321856.1067

چکیده

با ظهور ژنتیک مولکولی، ابزارهای مولکولی و بیوانفورماتیک، امکان تعیین ماهیت ژنتیکی صفات مطلوب در گونه‌های مختلف دامی فراهم گردید و با ورود به علم اصلاح‌نژاد دام و طیور، رویکردی جدید در راهبردهای اصلاح‌نژادی امکان‌پذیر شده است. اصلاح‌نژاد گسترده برای صفاتی همچون افزایش سرعت رشد و افزایش تعداد تخم‌مرغ‌های تولیدی در یک دوره باعث کاهش عملکرد تولیدمثلی و مقاومت در برابر بیماری‌ها شده است. به همین دلیل استفاده از حیوانات تراریخته به ویژه طیور به عنوان یک مدل برتر ژنتیکی در مطالعات ژنتیکی و فیزیولوژیکی می‌تواند مؤثر باشد. هدف از مطالعه حاضر، معرفی روش‌های مختلف انتقال ژن به ویژه دو روش کاربردی استفاده از سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انتقال ژن برای تولید طیور تراریخته به عنوان مدل برتر ژنتیکی در خصوص مطالعات ژنتیکی، پزشکی و دارویی است. روش‌های مختلفی برای انتقال ژن و ایجاد حیوانات تراریخته وجود دارد که دو روش استفاده از سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیشترین کاربرد را برای تولید طیور تراریخته دارند. سلول‌های زایای اولیه پیش‌ماده اسپرم و تخمک هستند که برای انتقال اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی به نسل‌های بعدی برنامه‌ریزی شده‌اند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از طریق فرآیند اسپرماتوژنز، اسپرم تولید می‌کنند. در نتیجه، علم بیوتکنولوژی و ویرایش ژنوم با افزایش تولید غذا و امنیت مواد غذایی و نیز کاربرد گسترده در علم پزشکی و دارویی در جمعیت رو به رشد جهان به سرعت در حال پیشرفت است و می‌توان از آن‌ها برای توسعه اهداف اصلاح‌نژادی در گونه‌های مختلف دامی به ویژه طیور و همچنین ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی و شرایط جغرافیایی مختلف استفاده کرد. کاربردهای علم بیوتکنولوژی در راهبردهای اصلاح‌نژادی دام و طیور بی‌پایان است.

کلمات کلیدی: انتقال ژن، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های جنسی اولیه، طیور تراریخته

***نویسنده مسئول:** kazem.rasouli@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۲ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۰۲/۲۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۳/۱۶ **تاریخ انتشار آنلاین:** ۱۴۰۰/۰۳/۲۵

رفرنس‌دهی: رسولی قره‌سقل، ک.، ژندی، م.، غفوری، ف. روش‌های انتقال ژن و استفاده از سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تولید طیور تراریخته؛ با رویکرد در زمینه‌های ژنتیکی، پزشکی و داروهای زیستی. *علمی- ترویجی (حرفه‌ای) دامستیک*، ۱۴۰۰؛ ۲۱(۱): ۵۰-۴۳.

مقدمه

اهلی شدن طیور توسط انسان دارای سابقه‌ای طولانی است، به گونه‌ای که از دیرباز تاکنون در تأمین پروتئین حیوانی انسان‌ها نقش به سزایی ایفا کرده است (Wang *et al.*, 2020). این درحالی است که تنها چند دهه از پرورش صنعتی طیور در جهان می‌گذرد. فرآیند پیشرفت و رشد این صنعت با توجه به اصلاح‌نژاد گسترده کنونی بسیار سریع است؛ به گونه‌ای که امروزه یکی از مهم‌ترین و با اهمیت‌ترین صنایع در بیشتر کشورهای جهان به شمار می‌رود. به طور کلی، مرغ‌های صنعتی به دو دسته جوجه‌های گوشتی با سرعت رشد بالا و مرغ‌های تخم‌گذار با قابلیت تخمگذاری بالا دسته‌بندی می‌شوند (Fouad and El-Senousey, 2014). در بسیاری از مناطق جهان به ویژه کشورهای توسعه نیافته و درحال توسعه، پرورش سنتی طیور یکی از راه‌های امرار معاش و دسترسی به منابع پروتئینی حیوانی ارزان قیمت است. با توجه به این که صنعت پرورش طیور یکی از پر درآمدترین صنایع حوزه دام و طیور است، استفاده از طیور تراریخته می‌تواند سودآوری اقتصادی بیشتری را نیز به دنبال داشته باشد (Mozdziak and Petitte, 2004).

با توجه افزایش روزمره جمعیت انسان‌ها امنیت غذایی و دارویی یکی از بزرگ‌ترین چالش پیش روی انسان است، به خصوص که الگوی زندگی روزمره و الگوی غذایی انسان‌ها تغییر کرده است و افزایش بیماری‌های مختلف همچون انواع سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی- عروقی را به دنبال داشته است. طیور به علت دارا بودن خصوصیات فیزیولوژیکی و ویژگی‌های ژنتیکی خاص، یکی از مناسب‌ترین جانداران به عنوان مدل‌های آزمایشی برای مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی هستند (Han, 2009). همچنین، استفاده از طیور در پژوهش‌های مربوط به بیولوژی، فیزیولوژی تکامل و پژوهش در حوزه فناوری‌های زیستی و ایجاد حیوانات تراریخته نیز به عنوان یک مدل برتر حیوانی بسیار مهم است (Woodcock *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019; Ghafouri *et al.*, 2020). وجود مزیت‌های تکنیکی قابل توجه در طیور همچون دوره پرورش کوتاه، ردیابی جوجه‌های حاوی ژن انتقال یافته در مدت زمانی کوتاه‌تر و ساختار ساده پروتئین‌های تخم طیور که به شکل معنی‌داری در خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب تأثیر مثبت دارد (Singh *et al.*, 2019)، باعث شده است که با وجود گزینه‌های مختلف، جوجه‌های تراریخته به عنوان منبع تجاری مهمی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه قرار گیرند. لذا پرندگان به سبب مواردی همچون هزینه پرورش و مدت زمان نگهداری کمتر، محیط استریل طبیعی تخم، تولید مقدار زیاد پروتئین در سفیده تخم و تولید تعداد زیاد تخم که از هر پرنده در سال تولید می‌شود، گزینه‌ای بسیار مناسب برای تولید پروتئین‌های درمانی در صنعت داروسازی هستند (Singh *et al.*, 2019). تکنیک‌هایی که به منظور تولید دام‌های تراریخته استفاده می‌شوند، اغلب ناکارآمد، زمان‌بر و پُرهزینه هستند. استفاده از فناوری تراریخته به دلیل اینکه بیشتر صفات مرتبط با عملکرد تولیدی و تولیدمثلی در گونه‌های مختلف دامی توسط بیش از یک ژن کنترل می‌شوند، اغلب محدود است. روش‌های جدید برای اصلاح ژنوم، حمایت و توسعه تحقیقات با استفاده از دام‌های تراریخته را تشکیل می‌دهند. این موارد نه تنها درک پژوهشگران از پایه زیست‌شناسی در گونه‌های تجاری را افزایش می‌دهند، بلکه ممکن است منجر به تولید حیواناتی شوند که در برابر بیماری‌های عفونی مقاومت بیشتری داشته باشند (Clark and Whitelaw, 2003).

بنابراین، استفاده از روش‌های نوین و کاربردی برای انجام کارهای اصلاح‌نژادی و فیزیولوژیکی در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی به‌خصوص طیور بسیار حائز اهمیت است. به طور کلی هدف مطالعه حاضر، معرفی روش‌های مختلف انتقال ژن به خصوص دو روش کاربردی استفاده از سلول‌های جنسی اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انتقال ژن برای تولید طیور تراریخته به عنوان مدل برتر ژنتیکی در خصوص مطالعات ژنتیکی، فیزیولوژیکی، پزشکی و دارویی است.

معرفی روش‌های مختلف برای انتقال ژن

اولین مرغ تراریخته با تزریق ویروس‌های لوکوز پرندگان (نوع وحشی و نوترکیب) به سلول‌های اولیه جنین مرغ، تولید شد. جوجه‌های تراریخته تولید شده از نوع موزاییکی و دامنه فراوانی انتقال DNA ویروسی از یک تا ۱۱ درصد متغیر بوده است (Salter *et al.*, 1987). برای تولید حیوانات تراریخته باید ژن مورد نظر را به جایگاه مد نظر متناسب با هدف در ژنوم جاندار مورد مطالعه انتقال داد که به این فرآیند، انتقال ژن گفته می‌شود. انتقال ژن به وارد شدن قطعه DNA خارجی به داخل مجموعه ژنوم یک جاندار یا ارگانیسم زنده گفته می‌شود، به گونه‌ای که ژن مورد نظر در سلول‌ها و بافت‌های مختلف جاندار گیرنده، DNA

خارجی تثبیت شده و همچنین توانایی بیان در سلول‌ها و انتقال به نسل بعد را داشته باشد (Houdebine, 2002). در دهه‌های گذشته، روش‌های مختلفی برای انتقال ژن به ژنوم حیوانات به کار گرفته شده است، تا جایی که در این زمینه موفقیت‌های بزرگی نیز به دست آمده است. امروزه در بسیاری از پژوهش‌های علمی در حوزه انسان و حیوانات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای از روش‌های مختلف انتقال ژن همچون تزریق به داخل پیش‌هسته (Hammer *et al.*, 1985)، انتقال هسته سلول‌های بدنی (Ashtiani *et al.*, 2008)، انتقال ژن از طریق ویروس‌ها (Pfeifer, 2004)، انتقال ژن از طریق اسپرم (Perry *et al.*, 1999)، استفاده از سلول‌های جنسی اولیه (Motono *et al.*, 2010) و استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Yu *et al.*, 2010) استفاده می‌شود. دسترسی به زیگوت‌های طیور بلافاصله پس از لقاح، برخلاف پستانداران که تخمک آن‌ها را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی بارور کرد و می‌توان به راحتی از آن‌ها برای دستکاری ژنوم استفاده کرد، بسیار مشکل است. با توجه به این که هر کدام از روش‌های ذکر شده دارای مزایا و معایب خاص خود هستند، امروزه به منظور تولید طیور تراریخته دو روش بیشترین کاربرد را دارند، که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد (Wang *et al.*, 2020).

جدول ۱- روش‌های مختلف انتقال ژن؛ شرح روش، بیان مزایا و معایب

نام روش	توضیحات	معایب و مزایا
تزریق به داخل پیش هسته	انجام این روش به لحاظ تئوری ساده است، به گونه‌ای که حجم کمی از ماده ترانس‌ژن مورد نظر را به داخل پیش هسته زایگوت تزریق کرده و سپس زایگوت‌ها را به رحم‌های گیرنده منتقل می‌کنند (Gordon *et al.*, 1980).	به دلیل اینکه زایگوت طیور در داخل تخم قرار دارد، استفاده از این روش در طیور امکان‌پذیر نیست؛ با این وجود بیشتر برای پستاندارانی همچون گوسفند استفاده می‌شود (Rexroad *et al.*, 1989).
انتقال هسته سلول‌های بدنی	این تکنیک شامل انتقال هسته از یک سلول دهنده (سلول‌های بدنی) به یک سلول گیرنده (تخمک بالغ) است که هسته سلول تخمک در آن حذف شده است، به عنوان مثال: تولد دالی در سال ۱۹۹۶.	این روش در طیور به دلیل اینکه تخمک توسط پوسته کلسیمی تخم احاطه شده است، امکان‌پذیر نبوده و بیشتر در پستانداران انجام می‌گیرد. رویانا اولین گوسفند شبیه‌سازی شده در ایران با استفاده از این روش ایجاد شد (Ashtiani *et al.*, 2008).
انتقال ژن از طریق ویروس‌ها	اساس انتقال ژن از طریق ویروس‌ها مبتنی بر انتقال ژن‌های خارجی به داخل جنین‌ها از طریق ویروس‌های نوترکیب است (Pfeifer, 2004).	مهم‌ترین عیب استفاده از ویروس‌ها در مقایسه با سایر روش‌ها، محدودیت اندازه ترانس‌ژن مورد استفاده است (Fassler, 2004)، همچنین ممکن است که موزاییکی بودن نتاج تراریخته (حضور و یا عدم حضور ژن انتقال داده شده در برخی از بافت‌ها و اندام‌های جاندار تراریخته) را به دنبال داشته باشد (Salter *et al.*, 1987).
انتقال ژن از طریق اسپرم	در این روش از اسپرم به عنوان حامل ترانس‌ژن به تخمک استفاده می‌شود. اولین زایگوت ترانسفکت شده با این روش در خرگوش ایجاد شد (Brackett *et al.*, 1971). تولید طیور تراریخته با استفاده از این روش نیز گزارش شده است (Harel-Markowitz *et al.*, 2009).	علی‌رغم گزارش‌های اولیه مبنی بر موفقیت‌آمیز بودن این روش، تاریخچه اولیه انتقال ژن از طریق اسپرم با مشکل عدم تکرارپذیری همراه بود و به همین دلیل این روش با انتقادهای زیادی مواجه شد.
استفاده از سلول‌های زایای اولیه	یکی از اصلی‌ترین راه‌حل‌های تولید طیور تراریخته، استفاده از سلول‌های زایای اولیه است.	در مواردی استفاده از این روش زمان‌بر بوده و تعداد نتاج بدست آمده نیز محدود می‌باشد.
استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی	استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یکی از راهکارهای جدید برای تولید طیور تراریخته می‌باشد.	استفاده از این روش در تولید طیور تراریخته به دلیل جدید بودن نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

استفاده از سلول‌های زایای اولیه برای تولید طیور تراریخته

سلول‌های زایای اولیه (PGCs: Primordial Germ Cells) سلول‌هایی هستند که به سلول‌های زایای بالغ تبدیل شده و در نهایت باعث تولید اسپرم و یا تخمک می‌شوند. در جنین طیور، سلول‌های زایای اولیه ابتدا از اپی‌بلاست به وجود می‌آیند و پس از گذشت حدود ۱۹- ۱۸ ساعت از انکوباسیون، از منطقه پلوسیدا (هلال زاینده) به هیپوبلاست منتقل می‌شوند (Wang *et al.*, 2020). سلول‌های زایای اولیه از هلال زاینده به سمت جریان خون حرکت می‌کنند و تا زمانی که به برآمدگی جنسی (جایی که در آن غدد جنسی طی انکوباسیون ایجاد می‌شوند) نرفته‌اند، در سیستم گردش خون باقی می‌مانند (Motono *et al.*, 2010). این سلول‌ها از طریق گردش خون جنین به قسمت تاج گوناد مهاجرت می‌کنند و در نهایت به گوناد‌های بالغ تبدیل می‌شوند (Nakamura *et al.*, 2007). لازم به ذکر است که سلول‌های زایای اولیه مرغ را می‌توان از خون جنین‌هایی که حدود ۵۴ ساعت را در انکوباتور سپری کرده‌اند، جداسازی کرد (Wang *et al.*, 2020).

تولید اولین طیور کایمری (Chimera Poultry) با استفاده از سلول‌های زایای اولیه به دست آمده از هلال زاینده جنین‌های در حال رشد و انتقال این سلول‌ها با استفاده از رتروویروس ضعیف شده در سال ۱۹۹۳ گزارش شد. از طیور کایمری تولید شده، نتاج نیز به دست آمده است (Vick *et al.*, 1993). به منظور تولید طیور کایمری، ابتدا سلول‌های زایای اولیه از جنین در حال رشد از ناحیه هلال زاینده و یا از خون (هنگامی که این سلول‌ها در خون در حال گردش هستند)، جداسازی می‌شوند و سپس خالص‌سازی صورت می‌گیرد و سپس در شرایط آزمایشگاهی کشت داده می‌شوند. سلول‌های زایای اولیه کشت داده شده در آزمایشگاه با استفاده از وکتورهای خاص که حامل ژن مورد نظر هستند، ترانسفکت شده و سپس به جنین در حال رشد، در مرحله‌ای که سلول‌های زایای اولیه در خون در حال گردش هستند، پیوند زده می‌شوند یا به بیضه‌های جوجه نابالغ تزریق می‌شوند (Singh *et al.*, 2019). سلول‌های زایای اولیه که ژنوم آن‌ها با استفاده از فناوری DNA نوترکیب دست کاری شده است، می‌توانند به جنین‌های گیرنده تزریق شوند و جوجه‌های کایمری تولید کنند. بعد از این که جوجه‌های کایمری به سن بلوغ رسیدند، بخشی از سلول‌های زایا (اسپرم یا تخمک) از سلول‌های زایای اولیه تزریق شده به این جوجه‌ها تولید می‌شوند (Wang *et al.*, 2020). گامت‌های دستکاری شده ژنتیکی تولیده شده از سلول‌های زایای اولیه پیوند شده، بعد از لقاح می‌توانند منجر به تولید جوجه‌های تراریخته شوند. از سلول‌های زایای اولیه منجمد شده نیز برای تولید طیور کایمری استفاده شده است (Divya *et al.*, 2021).

ناکامورا و همکاران در سال ۲۰۱۰، کاهش تعداد سلول‌های زایای اولیه درونی پس از تزریق بوسولفان (Busulfan) به جنین‌های گیرنده را گزارش کردند. آن‌ها سپس سلول‌های زایای اولیه کشت شده در آزمایشگاه را به جنین‌های تحت درمان با بوسولفان تزریق کرده و جوجه‌های کایمری تولید کردند. آن‌ها توانستند که از کایمرهای تولید شده، نتاج تراریخته تولید کنند. دستکاری ژنتیکی انجام شده در سلول‌های زایای اولیه پیونده شده، برای نسل‌های آینده قابل انتقال بود (Nakamura *et al.*, 2010). اخیراً کشت سلول‌های زایای اولیه، زمینه مطالعات ویرایش ژنوم در مرغ‌ها را به طور قابل توجهی گسترش داده است به گونه‌ای که استفاده از تکنیک‌های ویرایش ژن (Gene Editing) این امکان را در آینده مهیا می‌سازد تا تولید طیور تراریخته با اهداف خاص در راهبردهای طراحی شده میسرتر باشد. با این حال، مقدار سلول‌های زایای اولیه که از خون جنین به دست می‌آید (به میزان کمتر از پنج صدم درصد از کل سلول‌های خون) مهم‌ترین و اصلی‌ترین محدودیت فنّی استفاده از سلول‌های زایای اولیه برای انتقال ژن می‌باشد (Park *et al.*, 2003). پیشرفت‌های گسترده در مطالعات مرتبط با تولید طیور تراریخته، امکان استفاده از ناقل‌های لنتی ویروسی به عنوان یک راهبُرد کارآمد را برجسته‌تر می‌کند؛ به گونه‌ای که این فناوری می‌تواند فرصت‌های بیشتری را برای توسعه پژوهش در رابطه با طیور تراریخته فراهم کند (Jiang *et al.*, 2020).

استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای تولید طیور تراریخته

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs: Spermatogonial Stem Cells) سلول‌هایی هستند که شروع کننده فرآیند اسپرم‌سازی در جنس نر بوده و موجب حمایت آن می‌شوند. این سلول‌ها تنها گروهی از سلول‌های بنیادی جنس نر هستند که قابلیت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد را دارند (Miao, 2011). اخیراً در مطالعه‌ای از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای تولید بلدرچین کایمری استفاده شده است

(Han *et al.*, 2020). برای این که از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تولید حیوان تراریخته استفاده شود، در ابتدا باید سلول‌های مورد نظر را از بافت بیضه استخراج کرده و در شرایط آزمایشگاهی کشت نمود. ماندگاری و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی نیاز به محیط کشت غنی و مناسب دارد که برای غنی‌سازی محیط کشت از مواد و روش‌های بسیاری استفاده می‌گردد. استفاده از سلول‌های STO (سلول‌های مشتق شده از سلول‌های فیبروبلاست جنین موش) به عنوان لایه تغذیه کننده، استفاده از سرم جنین گاو (FBS: Fetal Bovine Serum) و یا استفاده از فاکتورهای رشد مناسب راهکارهایی برای غنی‌سازی محیط کشت هستند. فاکتور مهاری لوکمی (LIF: Leukemia Inhibitory Factor)، فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه (bFGF: basic Fibroblast Growth Factor) و فاکتور نوروتروفیکی مشتق شده از سلول گلیال (GDNF: Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor) فاکتورهای رشدی هستند که وجود آن‌ها در محیط کشت سبب افزایش خودنوزایی (تولید مجدد سلول‌ها) و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ می‌شوند (Rasouli-Gharehsaghal *et al.*, 2020). نتایج مطالعه رسولی قره سقل و همکاران (۲۰۲۰)، حاکی از آن است که حضور سه فاکتور مختلف رشد شامل bFGF، GDNF و LIF نقش بسزایی در تکثیر و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس‌های نابالغ در محیط آزمایشگاه دارد. همچنین گزارش شده است که این سه فاکتور رشد می‌توانند باعث افزایش جمعیت مناسب این سلول‌ها جهت انجام کارهای انتقال ژن و تولید طیور تراریخته گردند (Rasouli-Gharehsaghal *et al.*, 2020). بعد از کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه، این سلول‌ها با استفاده از وکتورهای خاص که حامل ژن مورد نظر هستند، ترانسفکت شده و سپس به بیضه جانور گیرنده پیوند زده می‌شوند. البته قبل از پیوند باید بیضه جانور گیرنده خالی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی درونی شود که برای این امر از روش‌های متفاوتی مانند تزریق بوسولفان، پرتودهی با اشعه گاما و روش‌های مشابه استفاده می‌شود (Ghadimi *et al.*, 2017).

با توجه به این که در حیوان نر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول‌هایی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند و این که یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی می‌تواند منجر به تولید تعداد زیادی اسپرم شود، دستکاری ژنتیکی این سلول‌ها یک فناوری جدید بالقوه است که امکان استفاده گسترده از آن‌ها برای گونه‌های مختلف حیوانی وجود دارد (Miao, 2011). موفقیت در پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و فرآیند اسپرماتوژنز حاصل از پیوند، که توسط سلول‌های پیوند شده در حیوان گیرنده ایجاد می‌گردد، می‌تواند منجر به باروری در جنس نر نابارور شود (Giassetti *et al.*, 2019). برای اولین بار پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به عنوان یک فناوری جدید در سال ۱۹۹۴ مطرح شد (Brinster and Zimmermann, 1994). پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ترانسفکت شده در حیوانات اهلی از گونه‌های مختلف نیز با موفقیت انجام شده است (Savvulidi *et al.*, 2019). هنگامی که کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه انجام می‌شود، می‌توان سلول‌ها را با ژن خارجی ترانسفکت کرد و سپس آن‌ها را به حیوان مورد نظر پیوند زد. به این ترتیب، بهره‌وری ترانسفکشن یا انتقال می‌تواند تا حد زیادی بهبود پیدا کند (Yan *et al.*, 2009). به عنوان مثال تولید موش‌های تراریخته دارای ژن خارجی پروتئین پیشرفته فلورسنت سبز (EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein) با استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انجام شده است (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008) و همچنین موفقیت در پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو به گیرنده غیرمشابه نیز گزارش شده است (Herrid *et al.*, 2006). در طیور نیز انتقال سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با روش‌های مختلف انجام شده است و سلول‌های ترانسفکت شده را به صورت مستقیم به بیضه خروس‌های گیرنده منتقل کرده‌اند (Li *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). از طرفی دیگر استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و یا سلول‌های بنیادی زایای اولیه می‌تواند به عنوان راهکاری علمی و عملی در تولید طیور مقاوم به بیماری‌ها باشد. به گونه‌ای که با استفاده از تکنیک ویرایش ژنوم (Genome Editing) می‌توان طیور تراریخته مقاوم به برخی بیماری ویروسی ایجاد کرد که با پیشرفت در این زمینه، امکان کاهش هزینه‌های درمان در صنعت طیور به وجود می‌آید (Min *et al.*, 2011). اخیراً نیز تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal Antibodies) نوترکیب در سفیده تخم‌مرغ از طیور تراریخته حاصل شده است (Mukae *et al.*, 2021). در طیور به دلیل این که بیضه‌ها داخل بدن قرار دارند،

پیوند زدن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ترانسفکت شده مستلزم انجام عمل جراحی است. همین موضوع باعث سخت‌تر شدن کار برای تولید طیور تراریخته نسبت به سایر پستانداران شده است. در طیور به دلیل این که سلول تخم توسط پوسته سخت کلسیمی احاطه شده است و لقاح آزمایشگاهی در آن امکان‌پذیر نیست، تولید جنین‌های تراریخته در آزمایشگاه از طریق سلول‌های جنسی اولیه به سختی انجام می‌شود و تعداد نتاج ترانسفکت شده با استفاده از این روش پایین است (Yu *et al.*, 2010). به همین دلیل، استفاده از روش جدیدتر و مقرون به صرفه‌تر می‌تواند کمک شایانی به تولید طیور تراریخته کند. البته تولید طیور تراریخته با استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به تعداد محدودی گزارش شده است، زیرا که این روش نیاز به پیشرفت‌های گسترده‌تری در خصوص روش‌های انجام شده دارد.

نتیجه‌گیری کلی

امروزه تلاش‌های گسترده‌ای در راستای اصلاح‌نژاد حیوانات اهلی به خصوص طیور، گاو، گوسفند و بز با استفاده از روش‌ها و تکنولوژی‌های نوین برای بهبود عملکرد تولیدی و تولیدمثلی صورت می‌گیرد. تولید طیور تراریخته به عنوان یکی از مدل‌های برتر آزمایشگاهی برای مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی می‌تواند به منظور افزایش و بهبود تولید پروتئین‌های حیوانی، مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی و همچنین استفاده‌های پزشکی و دارویی انجام شود. روش‌های مختلفی برای انتقال ژن به منظور تولید طیور تراریخته وجود دارد که در این میان به معرفی دو روش کاربردی استفاده از سلول‌های جنسی اولیه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پرداخته شد. استفاده از حیوانات تراریخته به ویژه طیور به عنوان یک مدل برتر ژنتیکی در راهبردهای اصلاح‌نژادی هدفمند و استفاده از آن‌ها در حوزه پزشکی و دارویی امروزه در بسیاری از کشورهای جهان رو به گسترش است. بنابراین، کاربرد علم بیوتکنولوژی و ویرایش ژنوم با افزایش تولید غذا و کاربرد گسترده در علم پزشکی و دارویی در جمعیت رو به رشد جهان به سرعت در حال پیشرفت است؛ هر چند که سؤالات زیادی در رابطه با اخلاق، محیط زیست، مسائل بهداشتی و سلامتی و فرهنگی در این خصوص وجود دارد و باید به آن‌ها پاسخ داده شود.

منابع

Ashtiani, S.K., Nasr-Esfahani, M.H., Hosseini, S.M., Moulavi, F., Hajian, M., and et al. (2008). "Royana: successful experience in cloning the sheep." *Yakhteh*, 10, 193-200.

Brackett, B.G., Baranska, W., Sawicki, W. and Koprowski, H. (1971). "Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(2), 353-357.

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). "Spermatogenesis following male germ-cell transplantation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 11298-11302.

Clark, J. and Whitelaw, B. (2003). "A future for transgenic livestock." *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 825-833.

Divya, D., Shukla, R., Chatterjee, R.N., Sagar, G., Prasad, A.R., and et al. (2021). "Production of Transgenic Chimeric Chicken from Cryopreserved Primordial Germ Cells and its Validation by Developing shRNA Transgenic Chicken Chimera." *Research Square*, 1-11.

Fässler, R. (2004). "Lentiviral transgene vectors." *EMBO Reports*, 5 (1): 28-29.

Fouad, A.M., and El-Senousey, H.K. (2014). "Nutritional factors affecting abdominal fat deposition in poultry: a review." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(7), 1057-1068.

Ghadimi, F., Shakeri, M., Zhandi, M., Zaghari, M., Piryaei, A., and et al. (2017). "Different approaches to establish infertile rooster." *Animal Reproduction Science*, 186, 31-36.

Ghafouri, F., Sadeghi, M., Bahrami, A., and Miraei Ashtiani, S. (2020). "Identification of genes affecting the amount of abdominal fat in broiler chickens using microarray and RNA sequencing data." *Iranian Journal of animal Science*, 50(4), 259-269.

Giassetti, M.I., Ciccarelli, M., and Oatley, J.M. (2019). "Spermatogonial Stem Cell Transplantation: Insights and Outlook for Domestic Animals." *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 385-401.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7380-7384.

Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., and et al. (1985). "Production of

Motono, M., Yamada, Y., Hattori, Y., Nakagawa, R., Nishijima, K.-i., and et al. (2010). "Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 315-321.

Mozdziak, P.E., and Petitte, J.N. (2004). "Status of transgenic chicken models for developmental biology." *Developmental Dynamics*, 229, 414-421.

Mukae, T., Okumura, S., Watanobe, T., Yoshii, K., Tagami, T. and et al. (2021). "Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens." *Genes*, 12(1), 38.

Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., and et al. (2010). "Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken." *Biology of Reproduction*, 83, 130-137.

Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Mushika, T., Ono, T., and et al. (2007). "Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo." *Poultry Science*, 86, 2182-2193.

Park, T.S., Jeong, D.K., Kim, J.N., Song, G.H., Hong, Y.H., and et al. (2003). "Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos." *Biology of Reproduction*, 68, 1657-1662.

Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., and et al. (1999). "Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection." *Science*, 284, 118.

Rasouli-Gharehsaghal, K., Shakeri, M., Zhandi, M., Amini, H.R., Yousefi, A.R. and Asadirad, M., (2020). Improvement of in vitro proliferation of cockerel spermatogonial stem cells using different combinations of growth factors. *British Poultry Science*, 61(6), 660-668.

Publisher Note

Animal Science Students Scientific Association, Campus of Agriculture and Natural Resources at the University of Tehran

Submit Your Manuscript:

https://domesticsj.ut.ac.ir/contacts?_action=loginForm

transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection." *Nature*, 315, 680-683.

Han, J.Y. (2009). "Germ cells and transgenesis in chickens." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 61-80.

Han, J.Y., Cho, H.Y., Kim, Y.M., Park, K.J., Jung, K.M. and et al. (2020). "Production of quail (Coturnix japonica) germline chimeras by transfer of Ficoll-enriched spermatogonial stem cells." *Theriogenology*, 154, 223-231.

Harel-Markowitz, E., Gurevich, M., Shore, L.S., Katz, A., Stram, Y. and et al. (2009). "Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone." *Biology of Reproduction*, 80(5), 1046-1052.

Herrid, M., Vignarajan, S., Davey, R., Dobrinski, I., and Hill, J.R. (2006). "Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients." *Reproduction*, 132, 617-624.

Houdebine, L.-M., (2002). "Animal transgenesis: recent data and perspectives." *Biochimie*, 84, 1137-1141.

Jiang, Z.Q., Wu, H.Y., Tian, J., Li, N. and Hu, X.X. (2020). "Targeting lentiviral vectors to primordial germ cells (PGCs): An efficient strategy for generating transgenic chickens." *Zoological Research*, 41(3), 281.

Kanatsu-Shinohara, M., Kato, M., Takehashi, M., Morimoto, H., Takashima, S., and et al. (2008). "Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells." *Biology of Reproduction*, 79, 1121-1128.

Li, B., Sun, G., Sun, H., Xu, Q., Gao, B., and et al. (2008). "Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo and ex vivo transfection." *Science in China Series C: Life Sciences*, 51, 734-742.

Miao, X.-Y. (2011). "Production of transgenic animals using spermatogonial stem cells." *Agricultural Sciences in China*, 10, 762-768.

Min, S., Qing, S.Q., Hui, Y.Y., Zhi, F., Rong, Q.Y., and et al. (2011). "Generation of antiviral transgenic chicken using spermatogonial stem cell transfected in vivo." *African Journal of Biotechnology*, 10(70), 15678-15683.

Domestic; 21 (1): 43-50

Scientific-Extensional (Professional) Journal

Domestic

Animal Science Students Scientific Association at the University of Tehran, Spring 2021

https://domesticsj.ut.ac.ir/article_81666.html

Review Article

Gene transfer methods and use of primary germ cells and spermatogonia stem cells in the production of transgenic poultry; with an approach in the fields of genetics, medicine, and biopharmaceutical

Kazem Rasouli-Gharehsaghal[1*], Mahdi Zhandi[2] and Farzad Ghafouri[3]

[1]M.Sc. of Animal Physiology, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources at the University of Tehran, Karaj, Iran

[2]Associate Professor of Animal Physiology, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[3]Ph.D. Student of Animal and Poultry Breeding & Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

https://doi.org/10.22059/domesticsj.2021.321856.1067

Abstract

With the advent of molecular genetics, molecular tools, and bioinformatics, it became possible to determine the genetic nature of desirable traits in different animal species, and with the introduction of livestock and poultry breeding science, a new approach in breeding strategies became possible. Extensive breeding for traits such as increased growth rate and increased number of eggs produced in a period has reduced reproductive performance and disease resistance. Therefore, the use of transgenic animals especially poultry as a superior genetic model in genetic and physiological studies can be effective. The aim of this study was to introduce different methods of gene transfer, especially the two applied methods of using primary germ cells and spermatogonia stem cells in gene transfer to produce transgenic poultry as a superior genetic model in genetic, medical, and pharmaceutical studies. There are several methods for gene transfer and transgenic animal production of which primary germ cells and spermatogonia stem cells are the most commonly used ones. Primary germ cells are precursors of sperm and eggs that are programmed to transmit genetic and epigenetic information to future generations. Spermatogonia stem cells produce sperm through the process of spermatogenesis. As a result, the science of biotechnology and genome editing is advancing rapidly with increasing food production and food safety, as well as widespread application in medicine and pharmaceutical science in the world's growing population, and it can be used to develop breeding goals in various animal species. It can be used to develop resistance to infectious diseases and various geographical conditions; the applications of biotechnology in livestock and poultry breeding strategies are endless.

Keyword(s): Gene transfer, Spermatogonia stem cells, Primary germ cells, Transgenic poultry

***Corresponding Author E-mail:** kazem.rasouli@ut.ac.ir

Received: 11 Apr 2021 **Revised:** 18 May 2021 **Accepted:** 06 Jun 2021 **Published online:** 15 Jun 2021

Citation: Rasouli-Gharehsaghal, K., Zhandi, M., Ghafouri, F. Gene transfer methods and use of primary germ cells and spermatogonia stem cells in the production of transgenic poultry; with an approach in the fields of genetics, medicine, and biopharmaceutical. *Professional Journal of Domestic*, 2021; 21(1): 43-50.