جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسی عوامل مؤثر بر کارایی روش تزریق مستقیم ژن به زیگوت موش جهت ایجاد حیوان ترانس ژن

رضا خیرخواهی اوغانی[1] ، مرتضی دلیری[2]*، علیرضا زمردی پور[2] و فریبا عطائی[2]**
[1]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، صندوق پستی ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵ ، تلفن _ ۶۸۷۳۵۲۰
rkoqani@yahoo.com،
[2]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، صندوق پستی ۶۳۴۳- ۱۴۱۵۵ ، تلفن _ ۴۵۸۰۳۸۵ ،
daliri@nrcgeb.ac.ir

چکیده:

تزریق مستقیم ژن هاي نوترکیب بداخل زیگوت، روش متداول در ایجاد تغییرات ژنتیکي درحیوانات آزمایشگاهي است. در این مطالعه تکنیك میکرواینجکشن در زیگوت موش اجرا و بهینه سازي گردید. سوزن تزریق ژن با اندازة های مختلف ساخته شد. محلول حاوي cDNA هورمون رشد انساني بداخل پیش هستهٔ نر در زیگوت ها تزریق گردید و زیگوت ها تا مرحلة ۲ و ۴ سلولي کشت داده شدند. لایة زونا پلوسیدا از جنین ها حذف و واکنش زنجیره اي پلیمراز (PCR) بر روي جنین ها با استفاده از پرایمر هاي اختصاصي cDNA هورمون رشد انساني و ژن β-actin (بتا اکتین) بعنوان کنترل انجام شد. در این مطالعه، نژادهاي مختلف موش به لحاظ پاسخ به هورمون هاي گونادوتروپین PMSG و hCG ، تأثیر سوزن هاي تزریق با قطر هاي مختلف در بقاء زیگوت ها و همچنین تأثیر محیط هاي کشت ساده و غني دستکاري زیگوت (M_2 و FHM)و کشت جنین (DMEM/F12 و KSOM)در رسیدن زیگوت هاي تزریق شده به مرحلة تقسیم بندي مورد ارزیابي قرار گرفته اند. نتایج این بررسي ها نشان داد که ۹۰% زیگوت هاي بدست آمده از زاده هاي نسل اول دو نژاد BALB/c و NMRI بعد از تزریق DNA در محیط DMEM/F12 به مرحلة ۲ سلولي رسیدند، محیط KSOM توقف در مرحلة ۲ سلولي را در این جنین ها از بین برد. محصول PCR جنین هاي ۲و ۴ سلولي بر روي ژل آگارز باندβ-اکتین (۲۵۰bp) را نشان داد، در ارتباط با cDNA هورمون رشد انساني باندي مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: زیگوت موش، دستکاری جنین، سوپراولاسیون، ترانسژنیک، میکرواینجکشن.

Evaluation of factors effecting microinjection of genom into the mouse zygote to produce transgeic animal

Rza Khaikhahi Oqani [1], Morteza Daliri [2]*,, Alireza Zomorodipour [2], Fariba Attaei [2]**
1-Science and Research Department, Azad Islamic University, P.O. Box 14155-4933, Tehran-Iran
2-National Center for Genetic Engeering and Biotechnology, P.O. Box 14155-6343, Tehran-Iran

Abstract:

Microinjection of genom in to the pronuclus of Zygote is common method of producing transgenic animal. In this study we have optimized the technique and effect of microinjection using various sizes of injecting needle, different culture media (M2, FHM, DMEM/F12 & KSOM), response of strains of mouse (BALB/c, NMRI, F1 of these two) to supperovulation and effect of DNA concentration solution into zygote and PCR analysis of integrated genom using specific primers for growth hormone gene and β-actin as control. Results showed high response of supperovulation in F1 hybrid, no lysis of zygotes were observed using type A needle, embryos reached at 4 cell stage in KSOM medium and PCR product showed only control band of β-actin in embryo and blood sample where as growth hormone gene not detected.

Key words: Mouse zygote, embryo manipulation, supperovulation, transgenic, microinjection

مقدمه:

اولین جانوران ترانسژنیك به طور آزمایشي از طریق تزریق DNA ویروسSV40 به داخل حفرة *بلاستوسیست* جنین موش ایجاد شدند(Jaenisch & Mintz,1974). ایجاد تغییرات ژنتیکي در موش تزریق مستقیم ژن بداخل یکي از پیش هسته هاي سلول تخم مي باشد. تزریق یك پلاسمید نوترکیب مشتق از pBR322 بداخل یکي از پیش هسته‌ها در زیگوت موش، اولین جانورترانسژنیك را بوجود آورد (Gordon., et al. 1980) . مطالعات نشان داده که پیش هستهٔ نر مکان مناسبتري براي تزریق مستقیم ژن در زیگوت است(Wagner., et al, 1981) . در ضمن عواملي مانند غلظت، اندازه و شکل(خطي یا حلقوي) DNA ، وضعیت سرهاي آزاد DNA خطي، جایگاه تزریق و نیز نوع بافر نگهدارندة DNA ، مي‌توانند در راندمان این روش مؤثر باشند. همچنین انتخاب نژاد مناسب موش جهت انجام آزمایش ها بسیار اهمیت دارد (Brinster., et al, 1985) . مطالعات نشان داده غلظت و شکل DNA مهمترین عوامل مؤثر بر دخول DNA بیگانه بداخل ژنوم موش هستند. نژادهاي مختلف موش به ویژه به لحاظ بیان ژن هاي انتقال یافته تفاوت دارند، موش هاي

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ترانسژنيك دو رگـة نسـل اول نژادهـاي C57BL/6 و SJL ، هشـت برابـر بيشـتر از مـوش هـاي ترانسژنيك نژاد خالص C57BL/6 ژن را بيان مي‌كنند (Brinster., et al, 1985) .

مواد و روش كار:

محلول DNA :
سازه ژنی cDNA نوتركيب هورمون رشد انساني تهيه گرديد. سازة ژنـي ساخته شده با غلظت ۲ نـانوگرم بر مـايكروليتر در بـافر نگهدارندة DNA شـامل ۱۰ ميلـي مـول Tris-HCl و ۰/۱ ميلـي مول EDTA در دماي ۴°C نگهداري شد. سوزنها با طول و قطرهای مختلف ساخته شدند.

تحريك تخمك گذاري:
مـوش هـاي مـادة ۵ تـا ۷ هفتـه اي نژادهـاي NMRI ، NIH و BALB/c و همچنـين نسـل اول(F1) BALB/c X NMRI با ۵ واحد بين المللي از هورمون PMSG بين ساعات ۱۳ تا ۱۵ داخـل صـفاقي تزريـق گرديـد. ۴۴ تـا ۴۶ سـاعت بعـد از تزريـق اول، ۵ واحـد بـين المللـي از هورمون hCG تزريق بلافاصله مادها با يك نر بالغ و هم نژاد خود در يك قفس قرار داده شدند. ۲۰ تا ۲۲ ساعت بعد، موشهاي پلاگ واژن دار انتخاب شدند.

جمع آوري تخمک ها و تزريق ژنوم :
بـه ۳۰ ميلـي ليتر از هر يك از محيط هاي M2 ، FHM و DMEM/F12 بـه مقدار ۱۵۰ ميلی گرم آلبومين سرم گاو (BSA) اضـافه و بصورت قطرک های ۵۰ ميكروليتري تهيه شد. بـه همين روش قطرك ها ی آنزيم هيالورونيداز ۰/۳ ميلـی گرم در ميلـي ليتر تهيه ودر انكوبـاتور دمـاي ۳۷°C با ۵ درصد CO_2 قرار داده شد. موشهاي داراي واژنيال پلاگ بـه روش كشيدن مهرة گردنـي كشته شدند. ديوارة ناحية آمپولا در محيط كشت (كـه بدليل وجود مجموعة سلول هاي تخم و سلول هاي كومولوس اطراف آنها بسيار حجيم و شفاف شده است) شكافته شد. حذف سلول هاي كومولوس در محيط آنزيم دار هيالورونيداز انجام شد. مقاومت زيگوت هاي حاصل از هر ۳ نژاد و زيگوت هاي F1 با استفاده ازدستگاه ميكرو اينجكشن Ependorf بدون تزريق هيچگونـه محلولي فقط بـا وارد شدن به پيش هستة نـر انجـام گرفت. زيگوت ها ی لايز شده يک ساعت بعد از تزريق و ۲۴ ساعت بعد از كشت در انكوباتور در مرحله جنين هاي دو سلولي مورد ارزيابي قرار گرفتند. سوزن تزريق بوسيله دستگاه ميكرواينجكشن به مقدار كـافي از محلول حـاوي DNA پر شد. مقداری از محلول بداخل پيش هستة نر تزريق گرديد به طوريكـه حجم پيش هسته تـا حدود ۲ برابر حجم اوليه افزايش يافت. بعد از ۲۴ ساعت كشت نرخ جنين هاي دو سلولي در مقايسه با جنين هاي شاهد (بدون دستكاري) بررسي شدند.

كشت جنين:
به ۵ ميلي ليتر محيط M16 ، KSOM يا DMEM/F12 به ترتيب۲۰ ، ۵ و ۲۵ ميلي گرم آلبومين سرم گاوی اضافه گرديد. زيگوت ها به قطرك ها انتقال يافتند و درانكوبـاتور بـه مدت ۲۴ الـی ۴۸ ساعت كشت داده شدند.

واكنش زنجيره اي پليمراز (PCR):
قبل از انجام PCR لاية زونا پلوسيدا بـا استفاده از محلول اسيد تـايرود حذف شد. جنين ها پس از شستشو به تيوپ هاي اپندورف ۰/۲ ميلي ليتري مخصوص PCR انتقال يافتند. پس از ۳ الـی ۴ بـار انجماد و ذوب، به تيوب جنين ها(۱۰ جنين در هر تيوب) به ميزان ۲۵ ميكروليتر بـافر PCR (1X) حاوي ۰/۹ ميكروليتر $MgCl_2$ (۵۰ ميلـي مولار) ، ۲ ميكروليتر dNTPs (۱۰ ميلـي مولار) و ۲ ميكروليتر از هر يك از پرايمرها و ۰/۵ ميكروليتر آنـزيم *Taq* DNA polymerase (2.5 U) اضـافه شـد. تيـوب هـادر واكـنش اول در دمـاي ۹۴°C بـه مـدت ۱ دقيقـه سـپس ۳۵ دور بـا برنامـه Denaturation در دمای ۹۴°C بمدت ۴۵ ثانيه، Annealing در دمـای ۵۸°C بمدت ۴۵ ثانيـه و Extension در دمای ۷۲°C بمدت ۱ دقيقه قرار گرفتند. در نهايت، نمونـه ها در دمـای ۷۲°C بـه مدت ۵ دقيقه قرار گرفتند. از سلول هاي خوني موش نيز بعنوان كنترل استفاده شد. نمونه ها در ۲% ژل آگارز الكتروفورز شد و پس از رنـگ آميزي بـا اتيديم بروماید، تحت تـابش پرتـو مـاورا بـنفش مشاهده گرديدند.

نتايج:

تحريك تخمك گذاري:
جدول شماره ۱ تعداد تخمک های بدست آمده از موشهاي نژاد BALB/c و F1 بـه طـور متوسط ۳۸/۶ و ۳۴/۸ است كـه نسبت بـه موشـهاي نـژاد NMRI (۹/۷) و NIH (۶/۴) بيشـتر اسـت و از طرفي اختلاف معني داري بين تعداد تخمک های بدست آمده از موشهاي تيمار شده و موشهاي شـاهد در نژاد BALB/c و F1 ديده مي شود در حاليكه در دو نژاد NMRI و NIH چنين اختلافي نسبت به حيوانات شاهد مشاهده نمي شود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تزريق ژنوم و مقاومت زيگوت ها :

محلول حاوي ۲ نانوگرم برميكروليتر DNA بداخل پيش هستهٔ نر در ۴۰ زيگوت F1 تزريق گرديد (شكل ۱). ۸۸% زيگوت هاي لايز نشده بعد از ۲۴ ساعت كشت به مرحلهٔ دو سلولي رسيدند. در ضمن تزريق محلول حاوي DNA با ۳ نوع سوزن A ، B و C در زيگوت هاي F1 نشان داد افزايش قطر خارجي سوزن تزريق موجب افزايش تعداد زيگوت هاي لايز شده مي گردد. نرخ جنين ها از نژادهاي مورد مطالعه در محيط هاي كشت ساده (M16 و KSOM) و غني(DMEM/F12) پس از تزريق DNA با سوزن نوع A درمرحلهٔ دو سلولي در محيط DMEM/F12 بالاتر است. از طرفي زيگوت هاي F1 در محيط KSOM به مرحلهٔ ۴ سلولي رسيدند.

واكنش زنجيره اي پليمراز (PCR):

۵ گروه ۱۰ تايي مورد بررسي قرار گرفتند، محصول PCR بر روي ژل آگارز باند β-اكتين (۲۵۰bp) در دو نمونه جنين و خون مشاهده گرديد (شكل شماره ۲). اما در ارتباط با cDNA هورمون رشد انساني باندي مشاهده نشد.

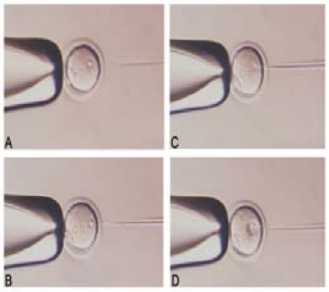
بحث:

با آنكه بيش از شش دهه از آغاز دستكاري جنين در پستانداران ميگذرد، اما ايجاد تغييرات دقيق و هدفدار در ژنوم پستانداران فقط در پانزده سال گذشته ميسر شده است. دليل اين وقفهٔ طولاني، دخيل بودن عوامل فراواني است كه در دستيابي به نتايج مطلوب مؤثرند. از جملهٔ اين عوامل ميتوان به شناخت ويژگي هاي ژنتيكي و فيزيولوژيكي حيوانات مورد استفاده، روشهاي تحريك تخمك گذاري به خصوص در دام، استحصال، دستكاري، و انجماد جنين، لقاح آزمايشگاهي، تكنولوژي DNA نوتركيب، تشخيص ژن انتقالي در مراحل اولية جنيني اشاره نمود. در اين مطالعهٔ در ميان سه نژاد اول تنها در نژاد BALB/c پاسخ مطلوب به هورمونها مشاهده شد. اين نتايج با يافته هاي *گيتس* (Gates, 1971) مطابقت دارد. در ميان نژادهاي خالصي كه *گيتس* مورد آزمايش قرار داد، ازنژاد BALB/c بيشترين سلول هاي تخم را بدست آورد. در دو رگه هاي بعضي نژاد ها و نژاد BALB/c نيز اين ويژگي مشاهده شد(Gates, 1971; Nagy *et al*., 2003). در زاده هاي نسل اول دو نژاد BALB/c و NMRI نيز پاسخ مطلوب به هورمون هاي گونادوتروپين مشاهده شد. مزيت هاي بكار گيري موشهاي دو رگه، افزايش مقاومت آنها به ميكرواينجكشن است(Hogan, 1994). زيگوت هاي BALB/c خالص نسبت به ميكرواينجكشن بسيار حساس اند به طوريكه فقط يك مورد گزارش از ايجاد BALB/c ترانسژنيك ارائه شده است (Takeuchi *et al*., 1993). در اين مطالعه در هيچيك از نژاد ها حساسيت به ميكرواينجكشن مشاهده نشد. بقاء زيگوت هاي بدست آمده از F1 بعد از دستكاری برابر با ۹۵% است و بعد از تزريق DNA نيز تنها ۱۰% زيگوت ها لايز شدند. اين مقادير حتي از استاندارد هاي جديد نيز بالا تر هستند(Richa, 2001). بررسي ها نشان داده است كه افزايش غلظت DNA تزريق شده از ۱ به ۱۰ نانوگرم بر مايكروليتر، رشد جنين ها را به مرحلهٔ بلاستوسيست از ۸۳% به ۴۵% كاهش مي دهد(Brinster *et al*., 1985). در اين مطالعه DNA با غلظت ۲ نانوگرم بر مايكروليتر باعث شد ۸۸% زيگوت هاي لايز نشد بعد از ۲۴ ساعت به مرحلهٔ دو سلولي برسند. در اغلب نژاد هاي موش، جنين ها در محيط كشت در فاز G2 از چرخهٔ سلولي دوم متوقف مي شوند. تنها معدودي از نژاد هاي خالص موش و دورگه هاي آنها جنين توقفي را نشان نمي دهند(Pratt, 1987). در اين مطالعه فقط زيگوت هاي بدست آمده از F1 در محيط KSOM به مرحلهٔ چهار سلولي رسيدند. اين نشان مي دهد كه محيط مذكور قادر است توقف در مرحلهٔ دو سلولي را در اين زيگوت ها رفع نمايد. در نمونه های PCR فقط باند β-اكتين مثبت بود، معمولاًدر يك جنين چند سلولي تعداد كپي هاي يك ژن تزريق شده از تعداد كپي هاي يك ژن خودي (كه در همهٔ بلاستومرها وجود دارد) ممكن است كمتر باشد. در اين صورت نمي توان از روش هاي معمولي PCR براي تكثير آنها استفاده نمود. به كارگيري روش nested PCR كه حساستر و دقيق تر است در اين راه ضروري به نظر مي رسد.

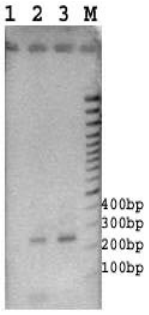
منابع:

1-Brinster RL., Chen HY., Trumbauer ME., Yagle MK. & Palmiter RD. (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4438–4442.
2-Gates AH. (1971) Maximizing yield and develpmental uniformity of eggs. In: *Methods in Mammalian Embryology.* ed. JC. Daniel. Freeman Co., San Francisco, pp. 64–75.
3-Gordon JW., Scangos GA., Plotkin DJ., Barbosa JA. & Ruddle FH. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 7380–7384.
4-Hogen B., Beddington R., Costantini F., & Lacy E. (1994) *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. Second ed. Cold Spring HarberLaboratory press, New York.
5-Jaenisch R. & Mintz B. (1974) Simian virus 40 sequences in DNA of healthy adult mice drived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 1250–1254.

6-Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. & Behringer R. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Third ed. Cold Sprins Harbor Laboratory Press. New York.
7-Pratt HPM. (1987) Isolation, culture and manipulation of pre-implantation mouse embryos. In: *Mammalian Development: A Practical Approach.* ed. M. Monk. IRL Press, pp. 13–42.
8-Richa J. (2001) Production of transgenic mice. *Mol. Biotechnol*. 17: 261–268.
9-Takeuchi T., Tanaka S. & Tanaka M. (1993) Expression of tyrosinase gene in transgenic mice: programmed versus non-programmed expression. *J. Invest. Dermatol*. 100: 141–145.
10-Wagner TE., Hoppe PC., Jollick JD., Scholl DR., Hodinka RL. & Gault JB (1981b) Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6376–6380.



شکل ۱ : تزریق محلول DNA بداخل پیش هستة نر.
A، B و C داخل شدن سوزن به پیش هستة نر را نشان مي دهد. D ، تزریق محلول و افزایش حجم



شکل ۲ : در ژل باند های ۱- کنترل منفي ۲- نمونة جنین (بتا اکتین)
۳- نمونة سلول خون موش (بتا اکتین) ۴- M سایز مارکر

جدول شماره ۱ : پاسخ به هورمون هاي گونادوتروپین در موشهاي NIH ، NMRI ، BALB/c و BALB/c X NMRI F1

نژاد	NIH		NMRI		BALB/c		BALB/c X NMRI F1	
	تیمار شده	شاهد	تیمار شده	شاهد	تیمار شده	شاهد	تیمار شده	شاهد
تعداد موش	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد موشهاي داراي واژینال پلاگ	۶	۱۰	۸	۱۰	۹	۱۰	۱۰	۹
تعداد کل تخمک ها	۵۸	۶۰	۷۸	۷۲	۳۴۷	۶۸	۳۴۸	۶۵
میانگین	۹/۶	۶	۹/۷	۷/۲	۳۸/۶	۶/۸	۳۴/۸	۷/۲