مطالعه مروری

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۰، شماره ۶، صفحات ۵۰۲ تا ۵۱۸، (۱۳۸۱)

حیوانات ترانس ژنیک

دکتر محمد رضا نوری‌دلوئی، استاد و مدیر گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
پروانه نیک پور، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

نخستین بار در سال ۱۹۸۱، دانشمندی به نام Gordon و همکاران با استفاده از روش خرد تزریق DNA (DNA Microinjection) ژنی بیگانه را به درون ژنوم موش وارد کردند. بدین ترتیب، اولین پستاندار تراریخت شده (Transgenic) شکل گرفت. امروزه روشهای متعددی برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک ابداع شده است که روشهای خرد تزریق پیش هسته ای، ناقل رتروویروسی، سلولهای پایه ای جنینی مهندسی شده، کروموزوم های صناعی و ادغام اسپرم از مهمترین این روش ها محسوب می شوند. فن ترانس ژنزیس به طور بالقوه کاربردهای متعددی دارد که می توان به اصلاح خصوصیات وراثتی، استفاده از حیوانات ترانس ژنیک به عنوان کارخانه های دارو و همچنین الگوهایی برای مطالعه بیماریهای انسانی و ایجاد اندام های اهدایی برای پیوند به انسان اشاره کرد. از سال ۱۹۹۷ با تولد Dolly (اولین پستاندار کلون شده)، امکان تلفیق فنون ترانس ژنزیس و کلون سازی، تحول عظیمی را در حوزهٔ زیست شناسی پدید آورده است، به نحوی که با ترکیب این دو فن می توان تغییرات ژنتیکی دلخواه را روی هر نوع سلول در محیط کشت انجام داد و موجود بالغی از آن سلول ایجاد کرد. بنابراین علاوه تمام کاربردهای ذکر شده در مورد فن ترانس ژنزیس، کلون سازی به طور بالقوه می تواند در مطالعات مربوط به مراحل رشد و نمو و یا حفظ گونه های در حال انقراض به کار رود. در این مطالعهٔ مروری، به جزئیات نسبی روشهای متعدد ترانس ژنزیس، کاربردهای آنها و مقایسه روشهای ذکر شده و نیز فن کلون سازی پرداخته شده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

مقدمه

تا پیش از پیشرفت‌های حاصل در ژنتیک مولکولی، مشاهدهٔ خصوصیات به ارث رسیده و یا جهش‌های خود به خودی، تنها راه مطالعهٔ تنظیم و عملکرد ژنهای پستانداران به شمار می‌رفت و طبیعتا" جداسازی یک ژن پستاندار و مطالعه آن در شرایط in vivo امکان پذیر نبود.

تا چند دههٔ پیش، زادگیری انتخابی (Selective breeding) تنها راه برای اصلاح ویژگیهای ژنتیکی حیوانات اهلی محسوب می‌شد؛ بدین مفهوم که در هر نسل، حیواناتی را با خصوصیات برتر مانند بازده بالای شیردهی، ویژگیهای مناسب پشم و میزان گوشت انتخاب کرده و با یکدیگر آمیزش می‌دادند. با این روش – که البته بسیار وقت گیراست – در خلال چندین نسل، ایجاد حیوانات با ویژگیهای مطلوب، تا حدی امکان پذیر بود.

در مورد مطالعهٔ بیماریهای ژنتیکی انسان نیز یا شماری از الگوهای حیوانی به طور طبیعی در محیط وجود داشت یا با استفاده از مواد شیمیایی، مواد جهش زا و پرتوها، الگوهای حیوانی ایجاد می‌کردند. با این وجود، این روش‌ها برای مطالعه اکثریت بیماریهای انسان مناسب نبود.

در خلال دههٔ ۱۹۷۰، اولین موشهای مهندسی ژنتیک شده ایجاد شدند؛ بدین منظور سلولهای دو جنین متعلق به دو نژاد مختلف موش با یکدیگر مجاورت داده شدند و جنینی واحد شکل گرفت که پس از رشد در بدن یک مادر پرورش دهنده، موشی که به دنیا آمد، نشانویژگیهایی از هر دو والد داشت.

با پیشرفت سریع قلمروهای مختلف زیست شناسی سلولی و مولکولی و از جمله درک بیشتر ارتباط متقابل زیست شناسی رشد و نمو و روشهای مهندسی ژنتیک، بستر مناسب برای رشد سریع و ابداع روشها و فنون ایجاد حیوانات تراریخت شده (Transgenic) فراهم آمد.

اولین بار در سال ۱۹۸۱ دانشمندی به‌نام Gordon و همکاران با استفاده از روش خرد تزریق DNA (DNA microinjection)، 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 موش، خرگوش، گوسفند و خوک به استخدام گرفته شد. طبیعتا" این روشها و فنون نیز توسعه فراوانی یافت و به طور مشخص و بدین منظور فنون متعدد دیگری نیز ابداع گردید و به کار گرفته شد. با این همه بیشتر مطالعات ترانس ژنیک روی موش انجام گرفته است؛ این امر دلایل متعددی به ویژه موارد زیر دارد:

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

۲- قدرت تولید مثل سریع (زمان بارداری موش، در حدود ۳ هفته است).

۳- همساختی (homology) بسیار بالای ژنوم موش با ژنوم انسان.

٤- دستاوردهای فراوان و رو به رشد در زمینه هایی مانند ژنتیک، فیزیولوژی، جنین شناسی، ایمنی شناسی و بیوشیمی موش.

درسال ۱۹۹۷ و در پی کلون سازی موفق یک پستاندار (به نام Dolly)، امکان ادغام فنون مربوط به ترانس ژنزیس و کلون سازی مهیا گردید. جزئیات نسبی این پیشرفتها، کاربردهای آنها و مقایسه روشهای مورد اشاره از مهمترین محورهایی است که در ادامه این نوشتار به آن پرداخته شده است.

برای درک بهتر مطالب، درهمین آغاز چند اصطلاح کلیدی را اندکی شرح می‌دهیم :

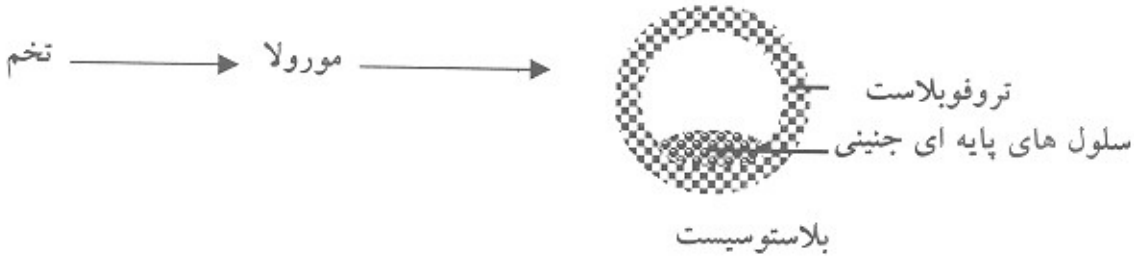
ترانس ژن (Transgene): ژنی بیگانه(Exogeneous) است که به شکل پایدار وارد ژنوم یک سلول یا موجود پیشرفته (Eukaryote) می‌شود. بدیهی است این ژن از منبع دیگری (به استثنای همان موجود) منشاء گرفته است.

حیوان ترانس ژنیک(Transgenic): حیوان واجد ژن بیگانه (ترانس ژن)، که 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 (Germ lines) نیز وارد شود. بنابراین، واردسازی ترانس ژن به ژنوم سلولهایی که در پی آن بتوانند به انواع مختلف سلولها اعم از سوماتیک و جنسی تبدیل گردند، از هدف‌های اصلی محسوب می‌شود. در عملیات ترانس ژنزیس(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 (Embryonic Stem Cells = ES Cells).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

پس توان (Totipotent): سلولی که قادر است به انواع سلولها اعم از سوماتیک و جنسی تبدیل شده؛ سرانجام به موجودی بالغ منجر شود. سلول اووسیت لقاح یافته دارای چنین ویژگی است.

چند توان (Pleuripotent): چنانچه می‌دانیم در پی تشکیل سلول تخم و پشت سر گذاردن مراحل اولیه تقسیم سلولی، مرحله ۳۲ سلولی، به نام بلاستوسیت خوانده می‌شود. سلولهایی را که در بخش درونی بلاستوسیست قرار دارند، سلولهای پایه‌ای جنینی گویند، این سلولها واجد خصلت چند توان هستند، بدین مفهوم که قادرند به تمام انواع مختلف سلولی تبدیل شوند. شایان تأکید است که یک سلول پایه‌ای جنینی، به تنهایی قادر به رشد در رحم نیست، بلکه برای تبدیل شدن به موجود بالغ باید درون یک بلاستوسیست قرار گیرد (شکل۱).



شکل ۱- بلاستوسیست و سلول‌های پایه‌ای جنینی

روشهای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک :

چنانچه پیشتر اشاره شد، امروزه روشهای متعددی برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک ابداع شده است که البته هر کدام محاسن و معایبی دارند. پنج روش زیر ازجمله مهمترین این روشها به حساب می‌آیند که در هر مورد، توضیح مختصری ارایـه می‌شود:

۱- روش خرد تزریق پیش هسته‌ای (Pronuclear microinjection).

۲- روش ناقل رترو ویروسی (Retroviral vector).

۳- روش سلولهای پایه‌ای جنینی مهندسی شده (Engineered embryonic stem cells).

٤- روش استفاده ازکروموزوم های صناعی مانند کروموزوم‌های صناعی مخمر (Yeast Artificial Chromosomes= YAC) وبه ویژه کروموزومهای صناعی پستانداران (Mammalian Artificial chromosomes = MAC)

٥- روش ادغام اسپرم (Sperm Fusion) و استفاده از پروتئین فلورسنت سبز(Green Fluorescent Protein= GFP).

۱- روش خرد تزریق پیش هسته‌ای:

در این روش باید تعداد کافی از سلولهای اووسیت لقاح یافته در دسترس داشته باشیم، بدین منظور سه روز پیش از شروع این روش لازم است که موشهای ماده را برای تخمک گذاری بیش از حد طبیعی (Super Ovulation) تحریک کنیم. بنابراین به موشهای ماده، سرم مادیان باردار (Pregnant mare Serum) و چهل و هشت ساعت بعد هورمون HCG (Human Chorionic Gonadotropin) تزریق می‌کنیم، در چنین شرایطی یک موش به جای ۱۰-۵ تخمک، حدود ۳۵ تخمک تولید می‌کند.

پس از این مرحله، موشهای ماده را برای حدود ۱۲ ساعت در جوار نرهای زایا قرار می‌دهند تا جفت گیری و لقاح انجام گیرد؛ در پی آن موشهای ماده را می‌کشند و اووسیت‌های لقاح یافته را از مجاری تخمدان آنها خارج می‌نمایند.

در پستانداران پس از دخول اسپرم به تخمک، هسته‌های نر و ماده به طور جداگانه حضور دارند و به آنها پیش هسته (Pronucleus) گویند. پس از تکمیل تقسیم میوز پیش هسته ماده، با ادغام دو پیش هسته با هم سلول تخم ایجاد می‌گردد. در پستانداران، به طور معمول پیش هسته نر، بزرگتر از پیش هسته

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

ماده است بنابراین در این روش، ترانس ژن بدون نیاز به ناقل و به کمک یک پیپت مناسب و با سر بسیار نازک (پیپت تزریق کننده) به درون پیش هسته نر که بزرگتر است و در زیر میکروسکوپ واضح تر دیده می‌شود، تزریق می‌گردد. ترانس ژن‌ها پس از ورود به هسته، از راه شکاف یا بریدگی هایی (Nicks) که به طور طبیعی در روی ژنوم وجود دارند، در درون ژنوم موجود ادغام می‌گردند. با وارد شدن یک ترانس ژن به درون ژنوم، به طور معمول چندین نسخه از آن به طور پشت سر هم (Tandem) در آن محل وارد می‌شوند.

پس از این مراحل و با اتحاد پیش هسته نر و ماده و تشکیل سلول تخم، به کمک جراحی در حدود ۴۰-۳۵ تخم در رحم مادر پرورش دهنده کاشته می‌شود تا مراحل رشد و نمو خود را تا تولد سپری کنند.

مادر پرورش دهنده، پیش از کاشتن تخم‌ها، بایستی با یک حیوان نر عقیم شده (Vasectomised) آمیزش داده شود. آمیزش با حیوان نر موجب ایجاد برخی از تغییرات فیزیولوژیکی و هورمونی در موش مادر شده و رحم موش برای پذیرش تخم‌ها و بارداری آماده می‌گردد. دلیل عقیم کردن موش نر این است که امکان باردار شدن موش مادر پرورش دهنده به طور طبیعی منتفی شود، زیرا در صورت باردار شدن موش مادر، به هنگام تولد، زاده‌ها مخلوطی از زاده‌های طبیعی و (احتمالاً) ترانس ژنیک خواهند بود که مطلوب نیست، زیرا باید حیوانات بیشتری برای ترانس ژنیک بودن مورد آزمون قرار گیرد.

معمولاً سه هفته پس از کاشتن جنین ها، موشها به دنیا می‌آیند برای اطمینان از ترانس ژنیک بودن آنها، با جدا کردن قطعه‌ای از دم و با فن بلات ساترن (Southern blot) و استفاده از نشانگری (Probe) که مکمل ترانس ژن باشد و یا PCR (با استفاده از پرایمرهایی که مکمل ترانس ژن‌اند)، می‌توان از ترانس ژنیک بودن موشها اطمینان بیشتری بدست آورد، به دلیل آنکه برای انجام بلات ساترن از دم موشها استفاده می‌کنند، به این فن، بلات دم (Tail blot) نیز گفته می‌شود (شکل ۲).

اگر چه روش خرد تزریق پیش هسته ای در زمرهٔ معمول ترین روشها برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک به شمار می‌رود، معایب متعددی نیز دارد:

الف) اگرچه این روش ظاهراً" ساده به نظر می‌رسد، اما مراحل فنی آن تجربه زیادی را می‌طلبد. به علاوه کارایی روش تقریباً" پایین است. بدین ترتیب که از هر هزار اووسیت لقاح یافتهٔ خرد تزریق شده، در میانگین تنها حدود ۵۰-۳۰ زادهٔ ترانس ژنیک عاید می‌شود. به بیان دیگر، بازدهی این روش چیزی درحدود ۵-۳ درصد می‌باشد.

ب) ترانس ژن به طور تصادفی درمکان‌های مختلف وارد ژنوم می‌گردد و متأسفانه تاکنون پژوهشگران نتوانسته‌اند مکان ورود ژن را تحت کنترل خود درآورند.

ج) به دلیل ادغام تصادفی در ژنوم، این امکان وجود دارد که ترانس ژن در وسط توالی ژنی عملکردی و مهم، که برای حیات حیوان ضروری باشد، وارد گردد و حیوان را دچار اختلالاتی جدی و جبران ناپذیر نماید.

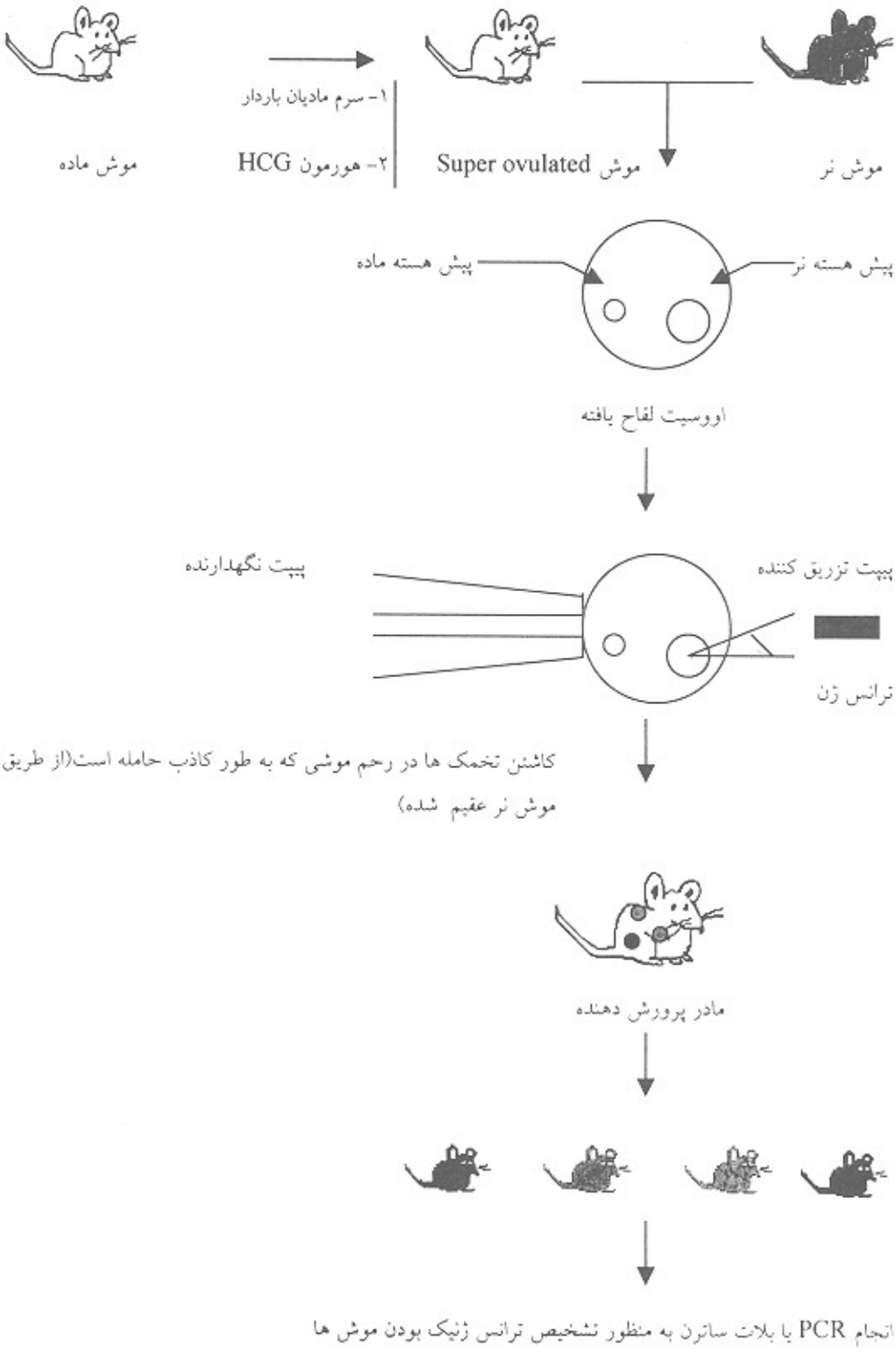
د) به دلایلی - مانند ادغام در همسایگی یک توالی تنظیم کننده خاموش گر (Silencer) - ممکن است ترانس ژن نتواند بیان شود.

ه) در هنگام ادغام با ژنوم، به طور معمول ۴۰- ۳۰ نسخه از ترانس ژن پشت سر هم قرار می‌گیرد که ممکن است بیان تمام یا بیشتر این نسخه‌ها (Over expression)، اختلالاتی ایجاد کند (شکل ۳).

۲- روش ناقل رتروویروسی :

در این روش، برای وارد کردن ترانس ژن به درون ژنوم، از ناقل رتروویروسی استفاده می‌شود. چنانچه می‌دانیم، ژنوم رتروویروس از جنس RNA می‌باشد، که پس از ورود به داخل سلول میزبان، در سیتوپلاسم سلول و با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase (RT) تبدیل به DNA شده و پس از مهاجرت به هسته، درون ژنوم الحاق می‌گردد و با رونویسی و ترجمه، اجزای کپسید و آنزیم‌های لازم برای عمل بسته بندی (Packaging) ساخته شده و رتروویروس‌ها از سلول میزبان جوانه می‌زنند. برای انجام عمل بسته بندی، در روی ژنوم رتروویروس، ردیفی بازی به نام Packaging Signal (Psi) حضور دارد، که در صورت فقدان این ردیف بازی، RNAهای ساخته شده قادر نیستند در درون کپسید قرار گیرند (شکل ٤).

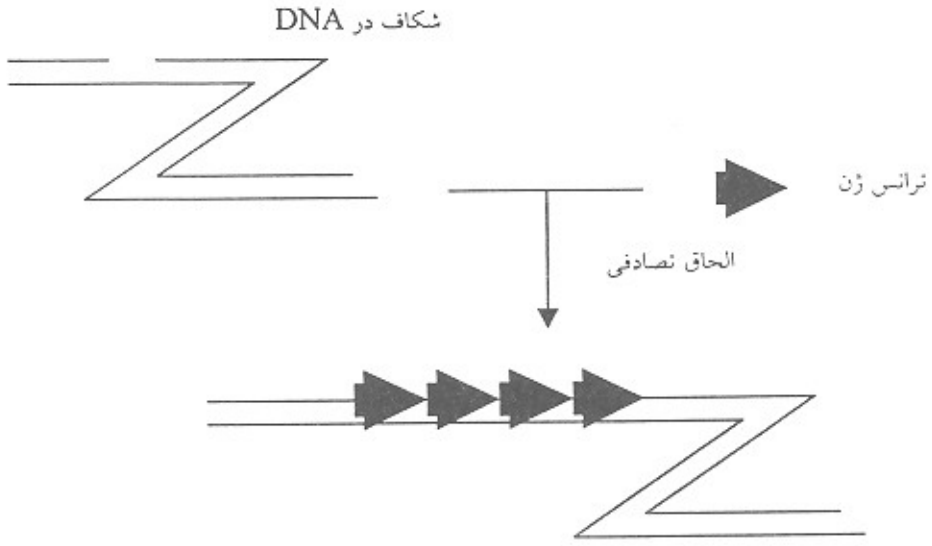
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]



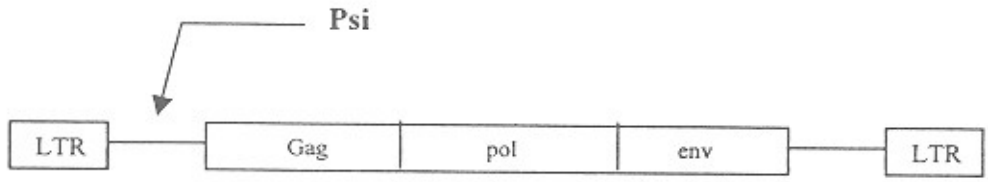
شکل ۲- فن خرد تزریق پیش هسته‌ای

در این روش، تمام ژنهای رتروویروس با ترانس ژن جایگزین می‌گردد، با این حال برای قرار گرفتن ترانس ژن در درون کپسید، به اجزای کپسیدی نیاز است که طبیعتا" ترانس ژن توانایی ساخت آن را ندارد. بدین منظور از یک رتروویروس مددکار (helper) استفاده می‌کنند. این ویروس ژنهای لازم برای ساختن اجزای کپسید را داراست و در عین حال فاقد علامت بسته بندی است و از این رو خودش نمی‌تواند داخل کپسید قرار گیرد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]



شکل ۳- الحاق چند نسخه از ترانس ژن درون ژنوم موجود



شکل ۴- ژنوم رترو ویروس و علامت Packaging (Psi)

دراین روش، همچنین به سلولی نیاز است که بتواند به طور مستمر رتروویروسهای حاوی ترانس ژن ایجاد کند و این رتروویروس ها، سلولهای مورد نظر را آلوده کرده و ترانس ژن به درون ژنوم آنها ادغام گردد.

بنابراین، با استفاده از فنونی پیچیده، چنانچه اشاره شد سلولی به نام سلول مددکار ایجاد می‌کنند و البته در آن دستکاریهای مناسبی انجام می‌دهند تا ترانس ژن مورد نظر در ژنوم آن ادغام گردد، همچنین یک رتروویروس مددکار و فاقد Psi نیز در ژنوم این سلول وجود دارد. عمل رونویسی از روی ترانس ژن صورت گرفته و ترانس ژن در شکل RNA در سیتوپلاسم سلول مددکار قرار می‌گیرد. رتروویروس ناقص و مددکار نیز اجزای کپسید و آنزیمهای لازم برای این عملیات را می‌سازد. بدین ترتیب بسته بندی ترانس در سیتو پلاسم سلول مددکار رخ می‌دهد، اما این رتروویروس چون فاقد Psi است، در داخل کپسید قرار نمی‌گیرد. بدین ترتیب سلول مددکار که در محیط کشت است می‌تواند شمار زیادی رتروویروس تولید کند که به جای ژنوم اصلی، واجد ترانس ژن هستند.

شایان ذکر است که سلول مددکار، در مجاورت جنین ۸ سلولی قرار می‌گیرد و رتروویروس‌ها به سلولهای جنینی حمله ور شده و ترانس ژن به شکل RNA وارد سیتوپلاسم آنها می‌گردد و سپس با کمک آنزیم RT، به DNA تبدیل شده و به درون ژنوم سلول‌های جنینی الحاق می‌گردد (شکل ۵). دیگر مراحل مربوط به این روش مانند روش پیشین است، انتقال جنین‌های دستکاری شده به رحم مادر پرورش دهنده و آزمون زاده ها پس از تولد با کمک فن PCR یا بلات ساترن .

الحاق با کفایت نسبی به درون ژنوم سلول گیرنده، و ادغام تنها یک نسخه از ترانس ژن در ژنوم هر سلول، ازجمله مزایای اصلی این روش محسوب می‌شوند.

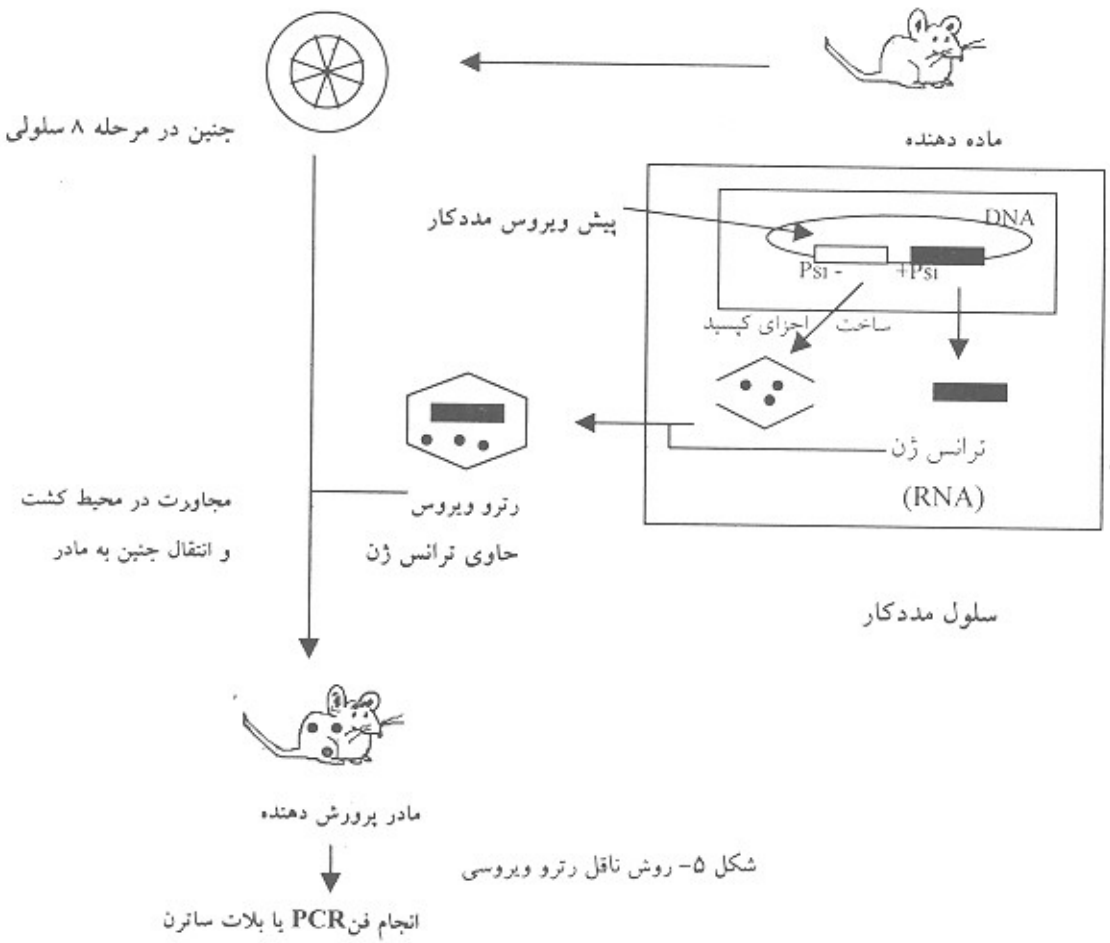
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

این روش همچنین محدودیت هایی دارد که چهار مورد زیر از مهمترین آنها به حساب می‌آیند:

الف) محدودیت در اندازه ترانس ژن (در حدود ۸ کیلوباز).

ب) الحاق تصادفی به درون ژنوم سلول.

ج) احتمال موزائیک شدن موجود (زیرا این امکان هست که رتروویروس به تمام هشت سلول حمله نکرده باشد و ترانس ژن تنها در برخی از این هشت سلول اولیه الحاق شده باشد) و نبودن ترانس ژن در رده سلولهای جنسی. این امکان نیز دور از ذهن نیست که از میان هشت سلول، سلولهای حاوی ترانس ژن در ایجاد سلولهای جنسی دخیل نباشند و بنابراین حیوان تولید شده، قادر به انتقال ترانس ژن به نسل بعدی نباشد.



شکل ۵- روش ناقل رترو ویروسی

۳- روش سلولهای پایه‌ای جنینی مهندسی شده:

از آنجایی که دو روش پیشین، معایبی دارند که الحاق کاملا" تصادفی ترانس ژن در ژنوم سلول که می‌تواند موجب از کار افتادن ژنهای اصلی موجود و ایجاد اختلالاتی در حیوان گردد؛ از مهمترین آنها به حساب می‌آید، دانشمندان به فکر استفاده از روشی افتادند که آنها را قادر سازد تا بتوانند ترانس ژن را به طور دقیق در هر محلی که مورد نظر آنها است، وارد کنند. این مکانها، معمولاً در محلی از ژنوم قرار دارند که الحاق ترانس ژن، تغییر قابل توجهی در عملکرد ژنها یا موجود ایجاد نکند.

در این روش از سلولهای پایه‌ای جنینی' مهندسی شده (Engineered embryonic stem cells) استفاده می‌کنند. این سلولها به سهولت در محیط کشت، رشد می‌کنند و پژوهشگران قادرند که به راحتی سلولهای پایه‌ای جنینی را مورد دستکاری ژنتیکی قرار دهند و سپس به کمک ژنهای نشانگر انتخابی (Marker genes)، سلولهای مورد نظر را گزینش کرده و آنها را در یک بلاستوسیست گیرنده تزریق کنند و بلاستوسیست حاصل را در رحم مادر پرورش دهنده بکارند تا حیوان ترانس ژنیک ایجاد شود.

طراحی ناقل: دراین فن هدف، الحاق ترانس ژن در محل ویژه‌ای از ژنوم می‌باشد. 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 که با قسمتی از ژنوم که ترانس ژن در آن جا وارد می‌شود همساختی دارد. وجود

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

همساختی بین این اماکن و HB، موجبات رخداد کراسینگ اور و الحاق را فراهم می‌آورد.

۳- Neo^r: ژنی است که موجب مقاومت به آنتی بیوتیکی به نام G418 می‌شود. این ژن، نوعی نشانگر قابل انتخاب (Selectable marker) محسوب می‌شود.

٤- 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 کنندهٔ DNAپلیمراز به حساب آمده و مرگ سلول را سبب می‌شود. در این ناقل، این ژن نیز نقش نشانگر قابل انتخاب را 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- سلول هایی 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.

طبیعتاً 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 (یعنی بدون استفاده از HBها) انجام گیرد، دو ژن TK نیز در امتداد سایر قسمتهای ناقل، وارد ژنوم می‌شوند. محیط کشت حاوی گانسیکلویر و G418 می‌باشد؛ بنابراین با وجود ژنهای TK، گانسیکلویر فسفریله شده و موجب مرگ سلول می‌گردد (شکل ٦- ب).

اگر الحاق با کمک کرا سینگ اور و قسمتهای همساخت (HB) انجام گیرد، دو ژن TK حذف شده و تنها ژنهای TG (ترانس ژن) و Neo^r باقی می‌مانند. در محیط حاوی گانسیکلویر وG418 این سلولها نمی‌میرند، زیرا Neo^r موجب مقاومت به G418 می‌شود وTK نیز وجود ندارد که روی گانسیکلویر اثر کند؛ بنابراین چنین سلولهایی که مورد نظر پژوهشگر هستند، در محیط کشت انتخاب می‌شوند (شکل ٦- ج).

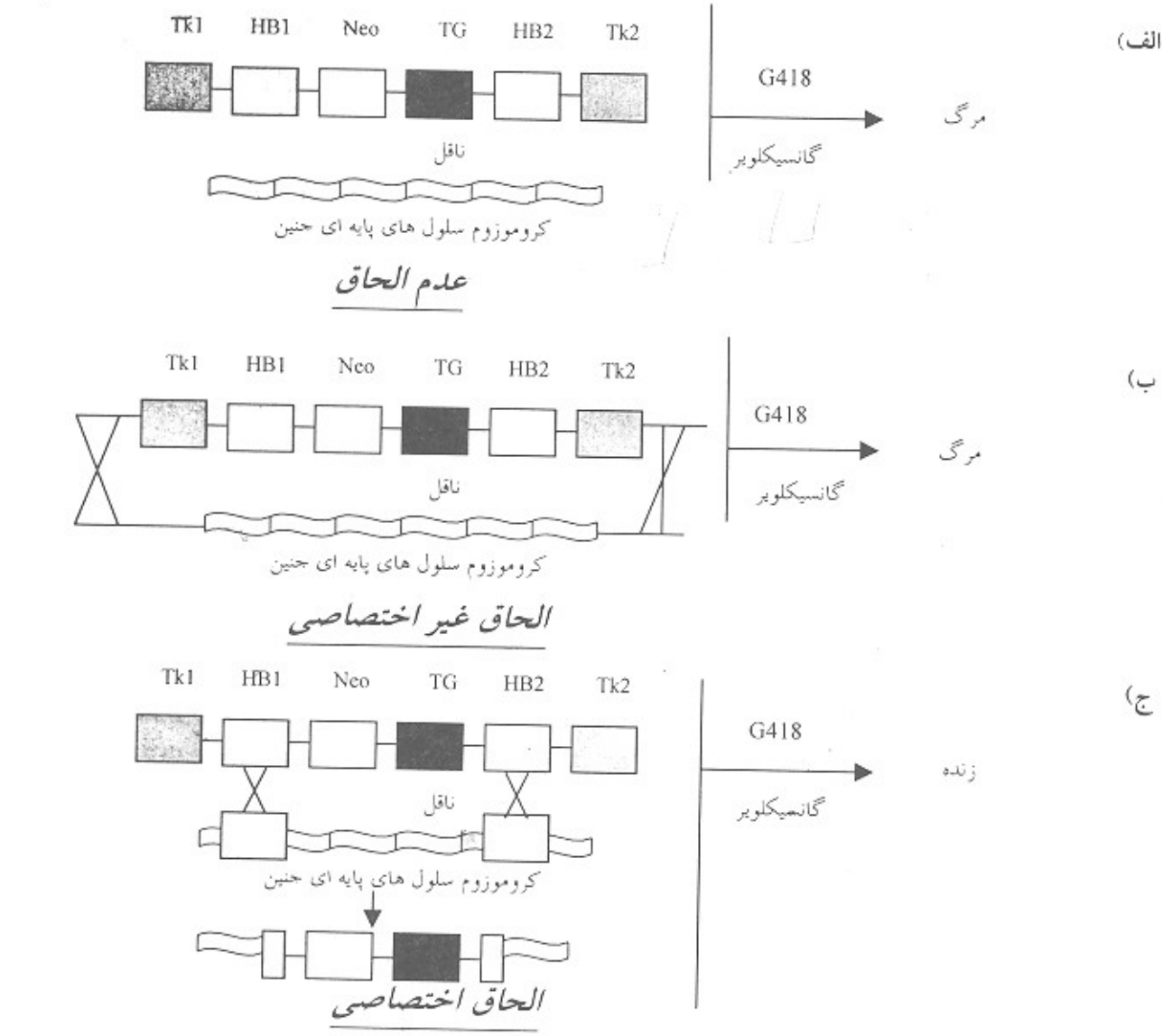
تأ کید می‌گردد که سلولهایی که ناقل را دریافت نکرده اند در محیط کشت حاوی G418 و گانسیکلویر می‌میرند، زیرا فاقد ژن Neo^r که موجب مقاومت به G418 می‌شود، می‌باشند (شکل ٦ الف).

پس از انتخاب سلولهای پایه‌ای مناسب و تزریق آنها به حفره بلاستوسیست گیرنده، سلولهای حاصل، درون رحم مادر پرورش دهنده کاشته می‌شوند تا زاده ها ایجاد شوند (شکل ۷).

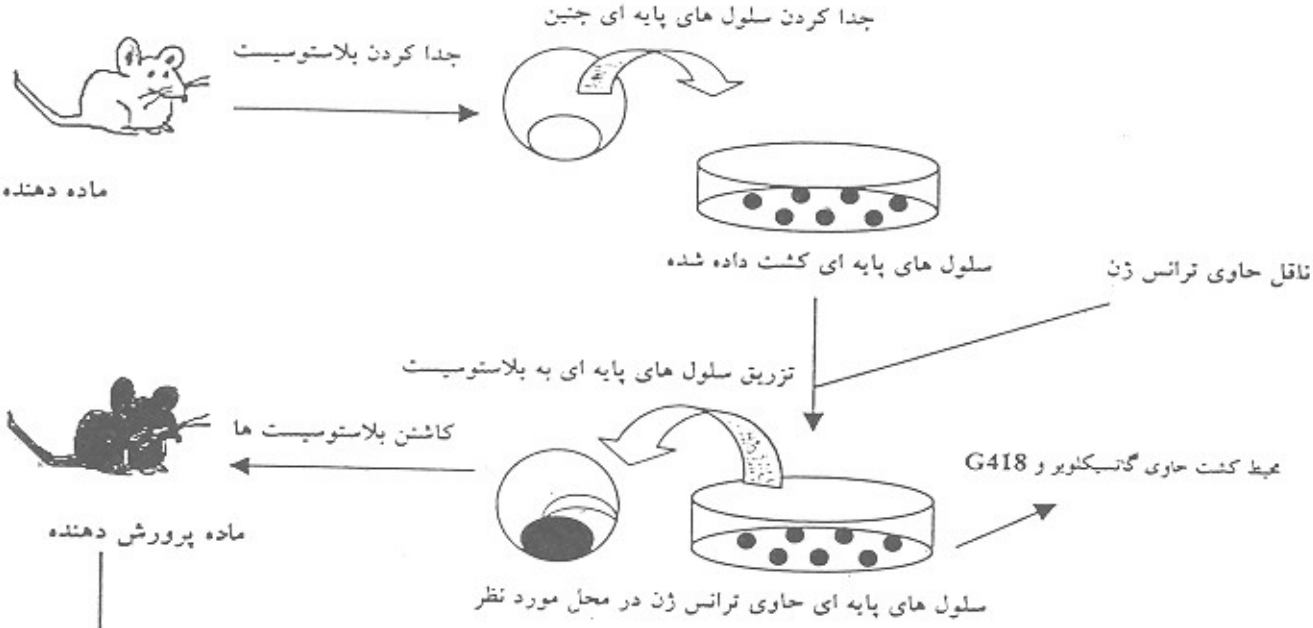
تشخیص حیوانات ترانس ژنیک: نظر به اینکه در ایجاد موجود ترانس ژنیک با این روش، دو دسته مختلف سلولی مشارکت دارند، موجود حاصل یک کای مرا (Chimera) است. توضیح بیشتر آنکه کای مرا یا شیمرا به مولکول DNA ی نوترکیب واجد ردیف‌های نوکلئوتیدی بیش از یک ارگانیسم اطلاق می‌شود. این نام از افسانه‌های یونانی گرفته شده است که بیانگر بزی است که دارای سری مانند شیر و دمی چون مار (ابلیس) می‌باشد. کای مری 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 بلاستوسیست است، غالب انتخاب می‌کنند در حالی که رنگ پوشش موش دهنده بلاستوسیست برای کاشت در رحم (بلاستوسیستی که سلولهای پایه‌ای جنینی به آن تزریق شده است) مغلوب می‌باشد. در نسل اول، زاده کای مر فنوتیپ لکه لکه (مخلوطی از دو رنگ) را نشان می‌دهد. از آمیزش این موش کای مر با موشی که رنگ پوشش مغلوب دارد- ودر صورتی که ترانس ژن در ردهٔ سلولهای جنسی نباشد - تمام زاده‌ها رنگ مغلوب خواهند داشت، اما اگر ترانس ژن در رده سلولهای جنسی موجود 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 ها، در تمام سلولهای هسته‌دار خود، حاوی ترانس ژن می‌باشند (شکل ۸).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

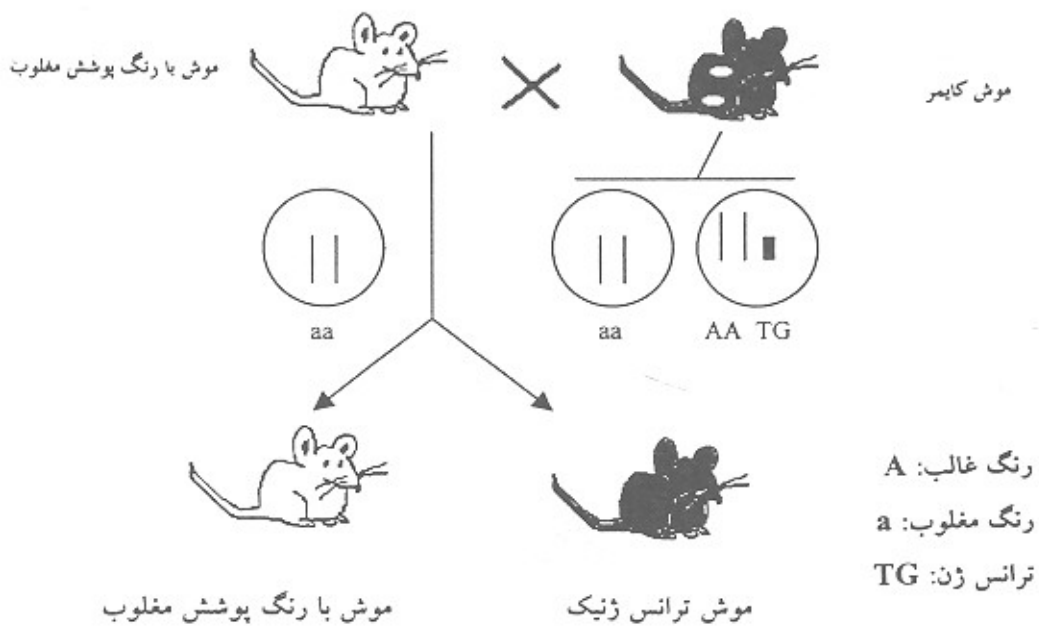


شکل ۶- روش انتخاب مثبت- منفی



شکل ۷- روش استفاده از سلول‌های ES مهندسی ژنتیک شده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]



شکل ۸- ایجاد موش ترانس‌ژنیک از موش کای‌مر

روش توصیف شده دربالا ،نیز مانند سایر روش‌ها مزایا و معایبی دارد:

الف) مزایا:

۱- سلولهای پایه‌ای جنینی موش به راحتی 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 لازم برای این روش را داشته‌اند و در دیگر موجودات امکان دستکاریهای دلخواه روی سلولهای پایه‌ای جنینی و ایجاد موجود ترانس ژنیک به این روش ظاهرا"امکان پذیر نبوده است .

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

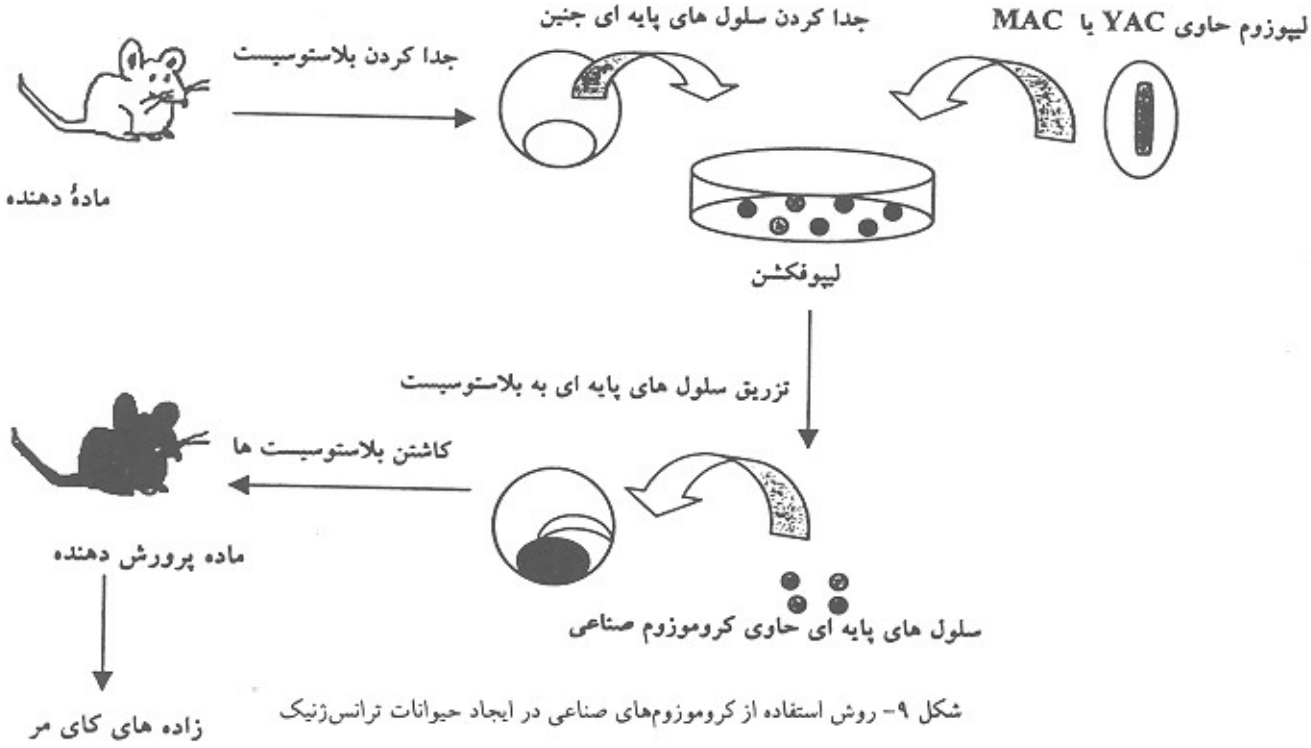
٤- روش استفاده از YACها و MACها:

چنانچه می‌دانیم هر ژن دارای نواحی کنترلی و تنظیمی مانند پروموتر است که الگوی بیان ژن را از نظر مکان و زمان بیان تنظیم می‌کنند. بنابراین چنانچه یک ژن، بدون نواحی کنترلی ویژه‌ای وارد میزبانی گردد، ممکن است بیان نشود یا اینکه در مکان و زمان غیر مناسب بیان گردد. اما از آنجایی که نواحی پروموتری بیشتر ژنها، به طور دقیق شناخته نشده است و یا اینکه برخی از نواحی تنظیمی در فواصل دوری از ژن قرار گرفته‌اند، طراحی یک پروموتر کارا، از نظر فنی، کار آسانی نیست.

بزرگترین اندازه‌ای از DNA که باروشهای مرسوم می‌تواند وارد ژنوم موش گردد، حدود ٤٠ کیلو باز می‌باشد. بنابراین برای اینکه بتوان یک ترانس ژن را با نواحی کنترلی ویژه اش وارد ژنوم یک سلول کرد، ناقلین با ظرفیت بیشتر مورد نیاز می‌باشد. بدین منظور، از کروموزوم‌های صناعی استفاده می‌شود؛ کروموزوم‌های صناعی دارای تلومر، سانترومر و توالی بازی مورد نیاز برای همانندسازی هستند. با استفاده از این کروموزومها می‌توان قطعات بزرگ DNA از ۳۵۰ تا ۲۰۰۰ کیلو باز را وارد میزبان کرد؛ به نحوی که این قطعه شامل ترانس ژن و عناصر تنظیمی ویژه آن باشد.

کروموزومهای صناعی مخمر (Yeast Artificial Chromosomes = YACs) و انواع جدید تر آنها به نام کروموزومهای صناعی پستانداران (Mammalian Artificial Chromosomes= MACs) از مهمترین کروموزومهای صناعی موجود به حساب می‌آیند. از آنجایی که اندازه این کروموزومها معمولا"بزرگ است، انتقال آنها با کمک پیپت منجر به تکه تکه شدن آنها می‌شود؛ بنابراین از لیپوزوم‌ها برای انتقال آنها به سلولهای پایه‌ای جنینی استفاده می‌گردد. فن استفاده از لیپوزوم را لیپوفکشن (Lipofection) می‌نامند (شکل ۹).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]



شکل ۹- روش استفاده از کروموزوم‌های صناعی در ایجاد حیوانات ترانس‌ژنیک

زمانی که کروموزومهای صناعی وارد هسته می‌شوند، به درون ژنوم وارد نمی‌گردند، بلکه به شکل اپیزومی (Episome) وجود دارند و در خلال تقسیمات سلولی معمولاً به شکل طبیعی جدا (Segragate) می‌گردند. در وضعیتی که از کروموزومهای صناعی برای انتقال ترانس ژن به موجود استفاده می‌شود، به جای واژه ترانس ژنیک از واژه ترانس کروموزومیک استفاده می‌شود. شایان ذکر است که در این روش نیز به دلیل ایجاد موش کای مر، همان معایب روش پیشین به چشم می‌خورد.

۵- روش ادغام اسپرم و استفاده از پروتئین فلورسنت سبز:

اخیراً روشهایی که پیشتر برای لقاح در خارج از موجود زنده (In Vitro Fertilization = IVF) در مورد انسانها به کار می‌رفت، به عنوان فنونی بالقوه برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک مورد توجه قرار گرفته است.

در یکی از اصلی ترین این روشها، برای وارد کردن ترانس ژن به اووسیت در شرایط in vitro، از اسپرم به عنوان ناقل، استفاده می‌کنند. این روش را تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection=ICSI) می‌نامند.

نخستین تجربه از این نوع، با استفاده از ژن رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز (Green Fluorescent Protein=GFP) انجام گرفت. زمانی که این ژن در بافت بیان شود بافت در زیر پرتوی ماورای بنفش UV (Ultra violet)، پرتو سبز ساطع می‌کند. با این روش مناسب، بیان یا عدم بیان ترانس ژن را می‌توان مشخص کرد.

دراین روش، ابتدا اسپرم‌ها در مجاورت غلظت مناسب مواد شوینده (Detergent) قرار می‌گیرند تا غشای اسپرم‌ها نفوذ پذیر گردد، سپس با ژن GFP مجاورت داده می‌شوند و در پی آن به کمک پیپت‌های ویژه ای، اسپرم به اووسیت لقاح نیافته تزریق می‌گردد. پس از سه روز، جنین‌ها به رحم مادر پرورش دهنده منتقل می‌شود. زمانی که به موشهای ترانس ژنیک ایجاد شده پرتو UV تابانده شود، پرتو سبز از زیر پوستشان 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 وYACها فراهم خواهد شد. با این همه، این روش هنوز درآغاز راه است و کارایی آن برای سایر موجودات (به استثنای موش) باید بررسی شود.

کاربردهای حیوانات ترانس ژنیک:

حیوانات ترانس ژنیک به طور بالقوه کاربردهای متعددی دارند که مهمترین آن به شرح زیر است :

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

الف) اصلاح خصوصیات وراثتی:

از جملـه مهمتریـن کاربـردهای ایـن حـیوانات و فـن تـرانس ژنزیس، بهبود پایدار صفات مورد نظر در حیوانات مزرعه‌ای مانند بازده شیر، خصوصیات پشم یا میزان تخم گذاری ماکیان می‌باشد.

روشـی کـه به طور معمول برای بهبود صفات استفاده می‌شود، زادگـیری انتخابـی (Selective breeding) اسـت، درایـن روش حـیوانات برتـر از نظـر خصوصیات مورد نظر، در هر نسـل انتخاب شده و آنها را با یکدیگر آمیزش می‌دهند. این کار، البته بسیار وقت گـیر بـوده و نسـل‌هـای زیـادی طـول می‌کشد تا بتوان حیوانات با خصوصیات برتر را به طور نسبتاً پایدار ایجاد کرد.

بـا اسـتفاده از روش تـرانس ژنـزیس و بـا شناسایی ژن مسئول خصوصـیت مـورد نظـر و اسـتفاده از آن بـه عـنوان تـرانس ژن، حیواناتـی ایجاد می‌شود که آن ژن را به عنوان بخشی از ژنوم خود حمـل مـی‌کنـند. در پـی آن، می‌توان در یک یا حداکثر دو نسل به آنچه که پیشتر در خلال سالها حاصل می‌شد، دست یافت.

عـلاوه بـر ایـن بـرای تغییر دادن محتوای شیر حیوانات نیز می تـوان از ایـن روش اسـتفاده کـرد. به طور مثال برخی افراد قادر به تحمـل لاکتوز شیر نیستند، اگر ژن لاکتاز را تحت پروموتری که در بافـت پستانی روشن می‌شود، به عنوان ترانس ژن استفاده کنیم، این ژن قـادر به بیان و سنتز آنزیم لاکتاز در شیر خواهد بود؛ بنابراین با تجزیه لاکتوز، اینگونه افراد نیز قادر به استفاده از شیر خواهند بود.

این روش همچنین برای ایجاد مقاومت به بیماریها در حیوانات مـزرعه‌ای بـا اسـتفاده از ژنهای مقاومت به بیماریها کاربرد فراوانی دارد.

ب) اسـتفاده از حیوانات ترانس ژنیک به عنوان کارخانه‌های دارو(بیوراکتورها):

چـنانچه مـی‌دانـیم در درمـان برخـی بـیماریها بـه موادی مانند انسـولین، عـامل‌های انعقادی و هورمون رشد نیاز است. در گذشته ایـن مـواد از خـون افـراد تهیه می‌شد که با دو مشکل عمده مواجه بود:

الف) میزان ماده حاصل ناکافی بود.

ب) احتمال آلودگی با ویروسها و... وجود داشت.

پـس از آن اسـتفاده از فـنون مهندسـی ژنتـیک و بهره گیری از سلولهای باکتری یا مخمر برای ساخت این مواد ابداع شدند، با این وجـود این شیوه‌ها نیز معایبی مانند تخلیص مشکل مواد مورد نظر، ضرورت استفاده از تجهیزات پیچیده و پیشرفته و کاملاً شبیه نبودن ایـن مواد به مواد طبیعی (به دلیل عدم وجود سیستم‌های پردازش و تعدیل‌کنندگی (modifying systems) مناسب در باکتریها) دارند.

با روش ترانس ژنزیس می‌توان ژن مسئول سنتز ماده‌ای ویژه را جـدا کـرد و آن را به پروموتوری مناسب وصل نمود که بیان ژن را بـه طـور مـثال تـنها در بافت پستانی موجب شود یعنی ویژهٔ بافتی (Tissue Specific) باشـد. بدیـن ترتیب، با بیان شدن ژن مورد نظـر در بافـت پسـتانی، پروتئیـن مـورد نظـر در شیر ترشح شده و براحتی می‌توان آن را از شیر تخلیص کرد.

از مزایای این روش می‌توان به خلوص آسان تر ماده مورد نظر، احـتمال آلودگـی کمـتر ، نگهداری راحت تر حیوان و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته اشاره کرد.

ج) الگوهایی برای مطالعه بیماریهای انسانی:

حـیوانات تـرانس ژنـیک را مـی‌تـوان به عنوان الگوهایی برای مطالعه انواع بیماریهای ژنتیکی انسان مورد استفاده قرار داد. در این روش، مـی‌توان ژن مسئول بیماری را کلون کرد، تغییرات دلخواه را روی آن انجـام داد و سـپس بـا فنون ترانس ژنزیس، حیوان ترانس ژنیکـی را ایجـاد کرد و اثر تغییرات هدفدار اعمال شده روی ژن را در محیط in vivo و تحت کنترل قرار گرفته مطالعه نمود.

بـا توجـه به همساختی زیاد بین ژنوم انسان و موش، استفاده از الگوهـای مـوش تـرانس ژنیک در فهم و درک بیشتر مکانیسم‌های بیماریهای انسانی، بسیار مدد کار می‌باشد.

د) اندام‌های اهدایی برای پیوند به انسان:

انـدام‌هـای اهدایـی بـرای پـیوند، بـه طور کلی با کمبود مواجه اسـت. امکـان اسـتفاده از اندامهـای سـایرگونـه‌هـا (Xenotrans plantation) نیز به دلیل واکنش شدید سیستم ایمنی انسان و پس زدن بافت پیوند، ناممکن به نظر می‌رسد.

هرچـند در خـلال مطالعـات متعدد، مشخص شده که اندامهای خـوک از نظـر انـدازه، فـیزیولوژی و آناتومـی بـه اندامهای انسانی شـباهت دارنـد بـا ایـن حـال هنوز قابلیت پیوند اندامهای خوک به انسان وجود ندارد.

بنابرایـن چـنانچه بتوان خوکهای ترانس ژنیکی ایجاد کرد که به جـای بـیان مولکولهـای مـربوط بـه خوک در روی سطح اندامهای خـود، مولکولهایـی از نـوع انسـانی روی سـطح اندامهایشان داشته باشـند و بـه طـور مثال، به جای ژنهای سازگاری نسجی (Major Histocompatability Complex = MHC) خوکـی، از ژنهـای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

MHC انسانی استفاده کنند، درآن صورت قابلیت پیوند زدن این اندامها به انسان فراهم می‌آید.

هـ) خارج نمودن ژنهای زیان آور:

با کمک روش ترانس ژنزیس می‌توان ژنهای زیان آور برای حیات موجود را خارج نمود. یک مثال ژن PrP (Protease Resistant Protein) در گاو و گوسفند است. این ژن پروتئینی به نام پریون (Prion) را رمزدهی می‌کند که به پروتئاز مقاوم است. چنانچه در ژن PrP جهش رخ دهد، منجر به ایجاد یک بیماری عصبی تحلیل رونده به نام اسکراپی (Scrapie) در گوسفند و جنون گاوی (Mad Cow disease) در گاو می‌شود. با روش ترانس ژنزیس، حیوانات ترانس ژنیکی ساخته‌اند که ژن PrP را ندارند (Knock out). این حیوانات به طور طبیعی زندگی می‌کنند و مشکلی ندارند، بنابراین می‌توان گوسفند یا گاوی ایجاد کرد که پروتئین پریون را نمی‌سازد و بنابراین دچار اسکراپی یا جنون گاوی نیز نمی‌گردد.

حیوانات ترانس ژنیک و ملاحظات اخلاقی:

اگرچه تولید حساب شده، کاملا" عالمانه و مسئولانه حیوانات ترانس ژنیک کاربردهای بسیار مفید و ارزشمندی دارد، اما از خطرات متعددی که پیرامون این پژوهشها می‌تواند پیش آید، هرگز نباید غفلت نمود.

ملاحظات اجتماعی و اخلاقی اینگونه پژوهشها، و بحث تفضیلی پیرامون کاربردها، چشم اندازها و چالشهای پیش رو، البته که مقاله مستقلی را می‌طلبد و دراین جا تنها می‌توان به طور بسیار گذرا و ناقص، نیم نگاهی به این موضوع بسیار با اهمیت انداخت:

بین سالهای ١٩٩٠ تا ١٩٩٩ تنها درکشور انگلیس، تعداد حیوانات ترانس ژنیکی که در پژوهشها مورد استفاده قرار گرفتند، بیش از ١٠ برابر افزایش داشت (از ٤٨٢٥٥ رأس به ٥١١٦٠٧ رأس): افزایش استفاده فزایندهٔ از حیوانات ترانس ژنیک، به دلایل متعددی موجب اعتراض برخی از پژوهشگران و مردم گردیده است. از نظر برخی صاحبنظران، تولید حیوانات ترانس ژنیک می‌تواند سلامتی این حیوانات را ازجنبه‌های مختلف مورد تهدید قرار دهد. به طور نمونه چنانچه پیشتر اشاره شد، شماری از روشهای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک به نتایج غیر قابل پیش بینی منجر می‌شود این مسئله به دلیل دخول ژن بیگانه در مکان نادرستی از ژنوم حیوان می‌باشد، اینگونه حیوانات معمولا" از بیماریها و اختلالات متعددی رنج می‌برند. علاوه بر این حیوانات ترانس ژنیکی که به عنوان الگوهای ویژه بیماریها تولید می‌گردند، به نحوی طراحی می‌شوند که تا حدامکان تمام نشانویژگیهای مرتبط با آن بیماری را نشان دهند، بنابراین این حیوانات احتمالا" از درد و رنج ناشی از آن بیماری نیز در امان نخواهند بود.

جدا از جنبهٔ سلامتی و حقوق حیوانات، این نکته که آیا انسان‌ها مجازند تنها برای حصول به اهداف خودشان به طور کاملا" مستقیم و در این حجم وسیع، ویژگیهای ژنتیکی حیوانات را دستکاری کنند، هنوز بحث جدی محامل علمی است. شایان تأکید است آنچه که گونه‌ها را از هم جدا می‌کند، تفاوتهای ژنتیکی است و بنابراین ما یک سگ را به عنوان سگ و یک موش را به عنوان موش تشخیص می‌دهیم. تکنولوژی ترانس ژنزیس این توانایی را دارد که با انتقال دادن ژنها، بین گونه‌های بسیار مختلف و دور از هم، برخی از این تفاوتها را از بین ببرد. یک مثال دراین مورد انتقال ژنهای انسانی به دیگر گونه‌های حیوانات است که می‌تواند منجر به ایجاد حیواناتی بسیار شبیه تر به انسان گردد. بنابراین این تغییرات وسیع در خصوصیات حیوانات می تواند تدریجاً جهت تکامل زیستی را تغییر دهد. مسئله‌ای که می‌تواند عواقب متعدد و وخیمی در پی داشته باشد.

بنابراین در کنار پژوهشهای وسیعی که در زمینه بهبود این تکنولوژی صورت می‌گیرد، شایسته است که مطالعاتی نیز به عواقب بالقوه گسترش این تکنولوژی اختصاص یابد.

کلون سازی :

تا سال ١٩٩٧، مطالعات ترانس ژنزیس و کلون سازی، به طور مستقل از هم پیش می‌رفتند، اما در این سال، تولد Dolly (اولین پستاندار کلون شده) و پس از آن، Polly (اولین پستاندار ترانس ژنیک با کمک فن انتقال هسته)، دیدگاه دانشمندان را نسبت به این دو فن آوری کاملاً متحول ساخت، به نحوی که این دو روش هم اکنون در ارتباط نزدیکی با هم می‌باشند.

چنانچه می‌دانیم، واژه کلون سازی مفاهیم متعددی دارد که دراین مقاله، منظور از آن ایجاد موجوداتی است که از نظر ژنتیکی کاملاً همسان باشند. امروزه، این کار با استفاده از انتقال دادن هسته یک سلول بدنی (سوماتیک) به درون سیتوپلاسم یک اووسیت که هسته اش خارج شده است انجام می‌گیرد. این فن تحت عنوان "انتقال هسته ای" (Nuclear Transfer) نامیده می‌شود، و با کمک این فن، اولین پستاندار کلون شده به نام دالی در سال ١٩٩٧ پا به عرصه حیات گذاشت.

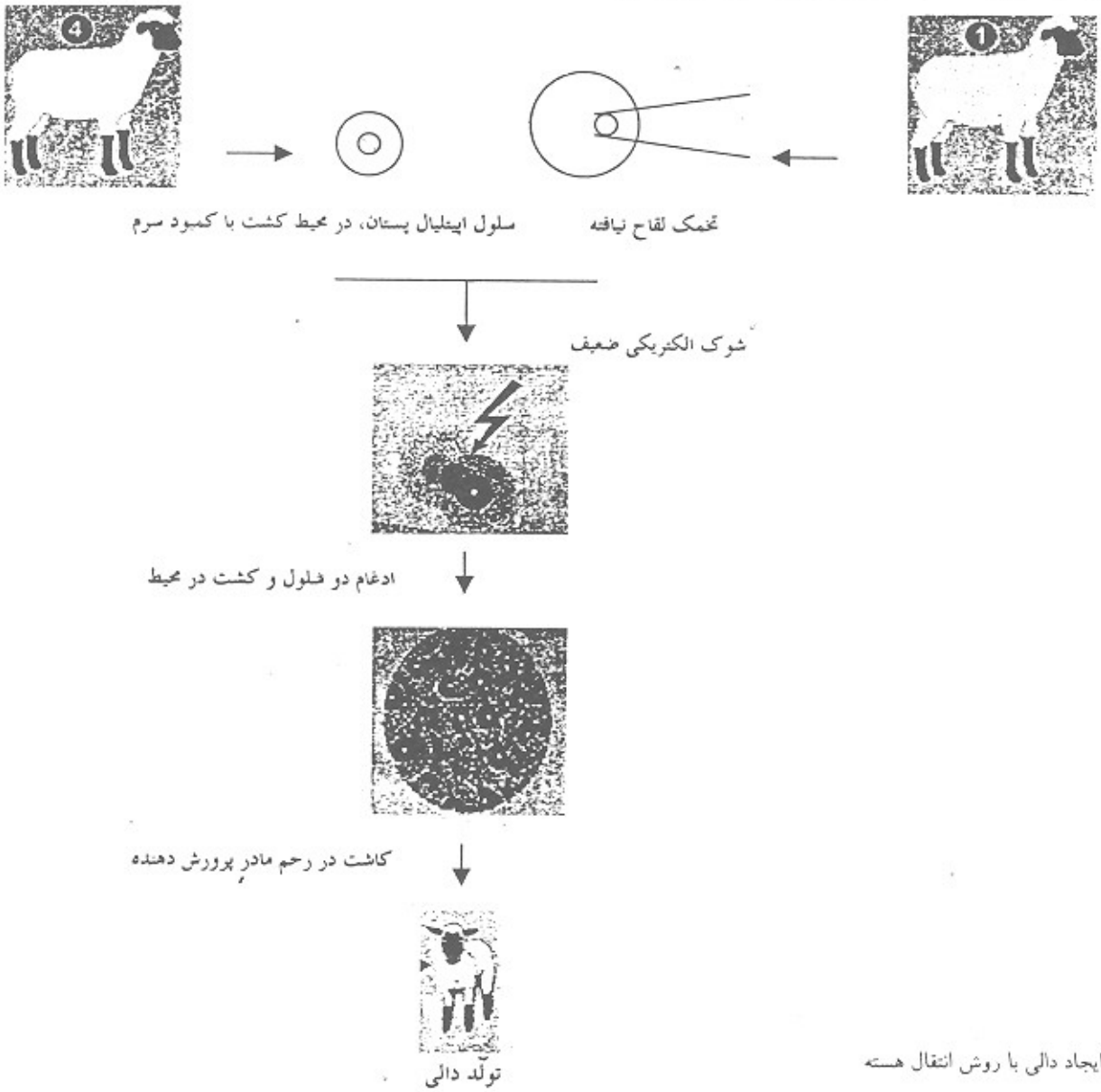
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

ایجاد دالی با فن انتقال هسته:

با برداشت سلولهای اپیتلیال از پستان یک گوسفند از نژاد Finn Dorset ewe، این سلولها در محیط کشت با کمبود سرم قرار گرفتند. کمبود مواد غذایی موجب می‌گردد که سلولها به مرحله G_0 (خاموشی)- در چرخه سلولی- وارد شوند.

همزمان یک تخمک لقاح نیافته از گوسفندی با نژاد Black face ewe اخذ شد و با کمک یک پیپت، محتویات هسته‌اش خارج گردید. با مجاورت دادن سلول اپیتلیال پستان با سیتوپلاسم خالی تخمک مورد اشاره و با ضربهٔ ضعیف الکتریکی موجبات ادغام آنها فراهم آمد.

سلول ادغام شده، حدود ٦ روز در محیط کشت رشد یافته و جنین حاصله به رحم یک گوسفند از نژاد Black face ewe انتقال یافت. پس از ۱۴۸ روز دالی بدنیا آمد که هم از نظر ژنتیکی و هم از جهت فنوتیپی با گوسفندی که سلول اپیتلیال پستانی را از آن گرفته بودند، یکسان بود (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- ایجاد دالی با روش انتقال هسته

دلیل قرار دادن سلول اپیتلیال در محیط کشت با کمبود سرم این است که چنانچه سلول در مرحلهS یا مرحله G2 باشد، پس از وارد شدن به سیتو پلاسم تخمک (egg) احتمال بروز ناهنجاریهای تعدادی کروموزومی زیاد می‌شود. اما چنانچه هسته در مرحله G_0 باشد، با سیتوپلاسم تخمک کاملا" سازگار است زیرا همه یا بیشتر ژنها خاموش بوده و فرصت بیشتری برای دوباره برنامه ریزی (Reprogramming) ژنها وجود دارد. به بیان دیگر، فرصت بیشتری هست تا شماری از عوامل سیتوپلاسمی روی ژنها اثر کرده و آن‌ها را به نحوی برنامه ریزی کنند که بتوانند دوباره خاصیت بس توانی خود را به دست آورند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

مقایسه کلون سازی و ترانس ژنزیس:

به حیوانی ترانس ژنیک گفته می‌شود که با استفاده از وارد کردن ژنهای جدید، خصوصیات وراثتیش دستخوش تغییر گردد. از طرفی حیوان کلون شده، حیوانی است که از نظر ژنتیکی، همسان با حیوانی است که از آن کلون گردیده است. بنابراین از نقطه نظر تعریف، به نظر می‌رسد این دو فن آوری هیچ ارتباطی با هم نداشته باشند. با این وجود با ترکیب فنون کلون سازی و ترانس ژنزیس، می‌توان تغییرات ژنتیکی دلخواه در محیط کشت را روی هر نوع سلول (علاوه بر سلولهای پایه‌ای جنینی) انجام داد و آنگاه با فن انتقال هسته و عملیات کلون سازی موجود بالغی از آن سلول ایجاد کرد.

چنانچه بیشتر اشاره شد در روش خرد تزریق پیش هسته، تنها می‌توان ژنهایی را اضافه کرد و در واقع امکان تغییر دادن ژنها وجود ندارد؛ سایر فنون نیز هر کدام معایبی دارد. ازاین رو تنها روشی که می‌توان تغییرات دلخواه روی ژنوم انجام داد، یعنی ژن مورد نظر را در مکانی دلخواه در ژنوم الحاق کرد، استفاده از سلولهای پایه‌ای جنینی می‌باشد؛ هرچند که استفاده از این روش، تاکنون تنها در موش موفقیت آمیز بوده است.

با استفاده از تلفیق دو فن کلون سازی و ترانس ژنزیس، می‌توان سلولهای سوماتیک را از سایر گونه‌ها جدا کرد و در محیط کشت، تغییرات دلخواه را در ژنوم آنها ایجاد نمود، در پی آن با به کار گیری فن "انتقال هسته"، این سلول‌ها را با سیتوپلاسم خالی از هسته تخمک، ادغام کرد و– با روش کلون سازی– موجود ترانس ژنیک ایجاد نمود. این روش اولین بار در مورد گوسفندی به نام Polly به کار گرفته شد، به نحوی که فیبرو بلاست گوسفند را در محیط کشت رشد دادند، آنگاه ژن مربوط به عامل ۹ انعقادی را وارد ژنوم فیبروبلاست کردند و ازآنجا که فیبروبلاست خاصیت بس توانی ندارد، آن را با سیتوپلاسم خالی از هسته یک تخمک گوسفند، ادغام کردند و جنین حاصل را در رحم یک گوسفند پرورش دادند و در نهایت گوسفندی به دنیا آمدکه در شیرش عامل ۹ انعقادی ترشح می‌کرد.

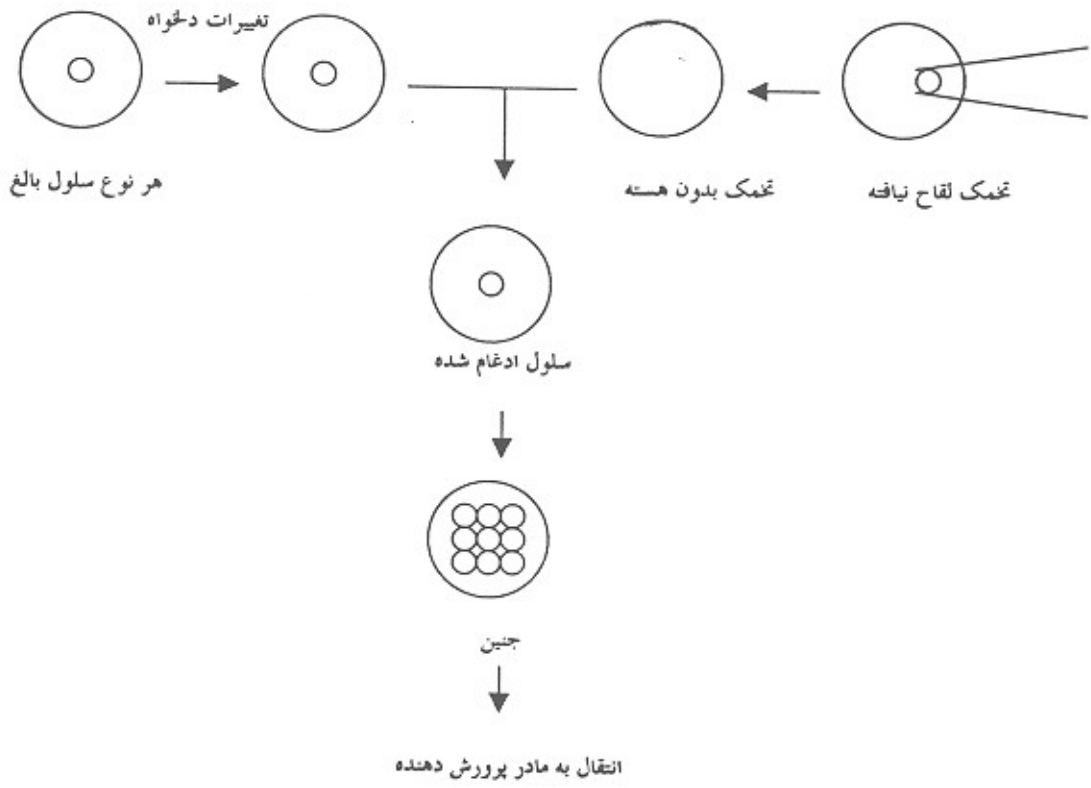
برتری دیگر تلفیق این دو روش در این است که در روش استفاده از سلولهای پایه‌ای جنینی، پس از انتقال سلولهای پایه‌ای جنینی واجد تغییرات دلخواه به بلاستوسیست گیرنده، موجودی کای مر حاصل می‌شود. به علاوه این امکان نیز هست که سلولهای ردهٔ جنسی این موجود فاقد ترانس ژن باشندکه البته برای فهم اینکه آیا این ژن به نسل بعدی انتقال می‌یابد یا خیر می‌باید در هنگام بالغ شدن اقدام به آمیزش موجود کای مر کرد؛ اما با فن انتقال هسته یک مرحله ازاین مراحل حذف می‌شود.

بدین صورت که می‌توان سلول تغییر یافته را با سیتوپلاسم خالی از هسته تخمک، ادغام کرد و موجود بالغ ایجاد نمود. دراین صورت با اطمینان می‌توان گفت که تمام سلولهای موجود حاصل، حاوی ترانس ژن خواهد بود(شکل ۱۱).

کاربردهای کلون سازی:

با تلفیق فنون کلون سازی و ترانس ژنزیس، تمام کاربردهای ذکر شده در مورد فن ترانس ژنزیس، در مورد روش کلون سازی نیز قابل تعمیم است. علاوه براین، استفاده از فن کلون سازی در مطالعات مربوط به مراحل رشد و نمو بسیار حائز اهمیت است. اینکه چگونه ژنوم یک سلول تمایز یافته می‌تواند خصوصیات دوران جنینی خود یعنی بس توانی را احراز کند، با مطالعات کلون سازی قابل بررسی است. کاربرد دیگر کلون سازی، حفظ کردن گونه‌های در حال انقراض است. با داشتن نمونه‌های خون، سلولهای پوست یا حتی فولیکول مو، می‌توان این سلولها را برای مدتهای مدیدی در نیتروژن مایع به صورت منجمد نگهداری کرد و سپس به کمک فن کلون سازی، این سلولها را در مجاورت تخمک بدون هسته قرار داد و حیوان در خطر انقراض را کلون کرد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]



شکل ۱۱- تلفیق فنون کلون‌سازی (انتقال هسته) و ترانس‌ژنزیس

منابع

1. Barnum, Susan R, Biotechnology: an introduction. Canada, Wadsworth Publishing Company, 1998.

2. Glick, B.R & Pasternak, J.J, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Ontario, Canada, ASM Press, 479- 505, 1994.

3. Strachan, T., Read, A.P, Human Molecular Genetics,UK, BIOS , 491-513, 1999.

4. Butler, D.,& Wadman, M., Calls for cloning ban sell science short. Nature; 386:8-9, 1997.

5. Campbell K.H.S., Mc Whir j., Ritchie W.A. & Wilmut I. Sheep Cloned by Nuclear Transfer from a Cultured cell Line. Nature; 380:64-66 , 1996.

6. Kahn A., Clone mammals Clone man?, Nature, 386:119, 1997.

7. Lutz D., Hello, Hello, Dolly, Dolly. The Sciences, May/ June: 10-11, 1997.

8. Solter D., Lambing by Nuclear Transfer. Nature, 380: 24-25, 1996.

9. Stewart C., An udder way of making Lambs, Nature, 385: 769 – 771, 1997.

10. Wadman M., Cloning for research should be allowed, Nature, 388: 6, 1997.

11. Wadman M., Republicans Seek to Widen Cloning ban, Nature, 387:748, 1997.

12. Wadman M., US panel to back longer cloning ban, Nature, 387: 217- 218 , 1997.

13. Wadman M., US to tighten Protection of Medical data, Nature, 388: 611, 1997.

14. Wilmut I., Schnieke A.E., Mc Whir j., & Kind A.j, Campbell & K.H.S., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, Nature, 385: 810- 813 , 1997.

15. Arthur C. & Laurence j. Cloning: questions and answers, [on – line]. Available on the www: url: http://www.ri. bbsrc. ac.uk/ library/ research/ cloning/ sindy q & a.html , 1997.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

16. SomaSekhar, M.. Dolly, Polly, ANDi... GM and cloning back with a bang, [on-Line]. Available on the www: url: http://www.hind - ubusiness Line. Com /2001/ 01/17/ Stories/041467 So. Htm , 2001.

17. Wilmut, I.. Potential benefits of cloning and Nuclear Transfer. [on- Line]. Available on the www: url: http://www.ri.bbsrc. ac.uk/ library/ research/ cloning/ nt – benefits 2.html, 1997.

18. Wilmut, I., Campbell K., & Tudge C..The Second Creation: Dolly and the age of biological control, [on-Line]. Available on the www: url: http://www.2 think. Org/dolly. Shtml, 2001.

19. Zinnen, T.M.. Cloning and Transgenic animals: the influence of technical confluences. [on–Line].Available on the www: url:http//www. access excellence. Com/AB/BA/casertudy 4.html, 2001.

20. Canadian Council on Animal Care (CCAC),. Transgenic Animals, Animal Welfare and Ethics, [on–Line]. Available on the www: url: http://www. Ccac. Ca/ English/ transsup. Htm, 1997.

21. Otago University, Transgenic animals: Methods, [on – Line]. Available on the www: url: http://Osm. Otago .ac.nz/main/ news/ tgmethod.htm 1999.

22. Otago University. Transgenic animals: Uses of genetically modified animals, [on – Line]. Available on the www: url: http://Osm. Otago. ac.nz/ main/news/ transgene. Htm, 1999 .

23. Roslin Institute online. Briefing notes on Nuclear Transfer, [on – Line]. Available on the www: url: http://www.ri. bbsrc.ac. uk/ library/ research/ cloning/ nt. L.html , 1997.

24. Roslin Institute online. Nuclear Transfer: a brief history. [on – Line]. Available on the www: url: http://www.ri. bb.src. ac.uk/ library/ research/ cloning/ nt. history 2.html, 1997.

25. Roslin Institute online. Cloning and Nuclear Transfer: a short glossary, [on – Line]. Available on the www: url: http://www.ri. bb.src.ac. uk/ library/ research/ cloning/ nt- technology.html, 1997.

26. Roslin Institute online. Cloning and Nuclear Transfer - Nuclear Transfer technology, [on – Line]. Available on the www: url : http://www.ri. bb.src.ac. uk/ library/ research/ cloning/ nt. technology.html, 1999.

27. Roslin Institute online. Cloning and Nuclear Transfer: Uses of cloning in farm animal production. [on – Line]. Available on the www: url : http://www.ri. bb.src.ac. uk/ library/ research/ cloning/ nt- Use2.html, 1999.

28. The cloning of Dolly and other mammals. [on–Line]. Available on the www: Url: http://www .biology. iupui. edu/ biocourses/ Bio 1540/ 16 cloning 2k. html, 2000.

29. Frequently asked questions relating to cloning & transgenic animals. [on – Line]. Available on the www: Url: http://enzymes. novo. dk/home/ environment /loqa.asp, 2001.

30. How dolly was cloned?. [on-Line].Available on the www:Url:http://www. human cloning. Org, 2001.

31. The cloning of Dolly. [on-Line]. Available on the www:Url:http://www. luc. edu/ depts/biology/dev/shclone. Htm, 2001.

32.Transgenic animals.[on-Line]. Available on the www:Url:http://www. ultranet. com/ jkimball/ biology pages/ T/Transgenic animals.htm, 2002.

33. Can humans be cloned? .[on-Line]. Available on the www:Url:http://www. ultranet. com/Biology/ pages/A/A.html, 2002.

٣٤- نوری دلوئی، محمد رضا، خسروی نیا، سامیه و مجید فر، فرهت (ترجمه همراه با اضافات)، فرهنگ مهندسی ژنتیک (نویسنده اصلی : اولیور، استفن ووارد، جان، ام)، انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، پاییز ١٣٧٣.

٣٥- طباطبائی، مجتبی، نوری دلوئی، محمدرضا و تقی بیگلو، چنگیز(ترجمه). بیوتکنولوژی مولکولی (نویسنده اصلی : پرایمرز.اس.بی) انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، زمستان ١٣٧٢.

٣٦- نوری دلوئی، محمدرضا، 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،شماره ٦و٧، پاییزو زمستان، صفحات ٣٨-٣١، ١٣٧٧

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]