حیوانات ترانس‌ژنیک یا تراریخت

معین حمیدی، کارشناس ارشد میکروبیولوژی

میعاد بنی‌طرفی، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی

انتقال ژن (Transgenesis) به مفهوم وارد شدن یک توالی DNA خارجی به داخل ژنوم یک موجود زنده چندسلولی است، به‌طوری‌که ژن موردنظر در اغلب سلول‌های آن حضور داشته و به نسل بعد منتقل شود. در گذشته از اصطلاحات موجودات تغییریافته ژنتیکی، (Genetically Modified Organisms; GMO) گیاهان تغییر یافته ژنتیکی (Genetically Modified Plants; GMP)و حیـوانات تغییریافته ژنتیکی (Genetically Modified Animals; GMA) استفاده می‌شد (1). انتقال ژن به‌منظور افزودن اطلاعات ژنتیکی خارجی به ژنوم یک موجود زنده، سرکوب کردن یک ژن داخلی و جایگزین کردن یک ژن و یا یک ژن کاربردی که ممکن است جهش‌یافته همان ژن یا یک ژن کاملاً متفاوت با ژن بومی باشد، انجام می‌گیرد. سرانجام در اغلب تحقیقات، افزودن یک ژن خارجی به ژنوم میزبان منجر به ایجاد یک پروتئین با یک عملکرد فیزیولوژیکی خاص می‌گردد (2). تولید داروهای تجاری از طریق حیوانات ترانس‌ژنیک یکی از مهم‌ترین کاربردهای این تکنولوژی است که زیست‌دارو (Biopharming) نام دارد؛ به‌عنوان مثال می‌توان به تغییر خصوصیات تغذیه‌ای شیر گاو برای استفاده کودکان و بهبود عملکرد حیوانات اشاره کرد (2). گاوهای ترانس‌ژنیک دارای ژن‌های کاپا و بتاکازئین ترکیب شیر بهتری دارند (6).

تاریخچه:

در سال ۱۹۷۱ Brackett و همکاران روش استفاده از اسپرم به‌عنوان ناقل ژن در خرگوش را مورد بررسی قرار دادند (7)، با این حال گزارش موفقیت‌آمیزی تا سال ۱۹۷۶ منتشر نگردید. در سال ۱۹۸۰ Gordon و همکاران نشان دادند استفاده از روش ریزتزریق DNA (Microinjection of DNA) داخل پیش‌هسته سلول تخم (Pronucleus of zygote) یک روش کارآمد در تولید جمعیت‌ها (Germ line) و ایجاد فرزندان انتقال ژن یافته است. روش ریزتزریق DNA تکثیر شده (Cloned DNA) داخل پیش‌هسته تخم لقاح‌یافته به‌عنوان یک روش کاربردی و موفقیت‌آمیزترین روش در تولید حیوانات انتقال ژنی تا به امروز معرفی گردید (1). در سال ۱۹۹۶ پس از به دنیا آمدن دالـی گوسـفند مشـهور، تکـنولوژِی انتـقال هسته (Nuclear transfer technology) و تولید افراد با ژنتیک یکسان از سلول‌های جنینی و یا سوماتیک (7) نیز به‌عنوان یکی از روش‌های تولید حیوانات انتقال ژنی موردتوجه قرار گرفت.

نخستین حیوانات تراریخته «ترنس‌ژن» خاورمیانه که ۱۹دی‌ماه سال ۱۳۸۸در پژوهشکده رویان متولد شدند، شنگول و منگول نام گرفتند. بزهای تراریخته تولیدی که حامل ژن تولید پروتئین نوترکیب انسانی مؤثر در درمان مبتلایان هموفیلی نوع B هستند، در شیر خود فاکتور ۹ انعقادی خواهند داشت.

انواع روش‌های تولید حیوانات تراریخت

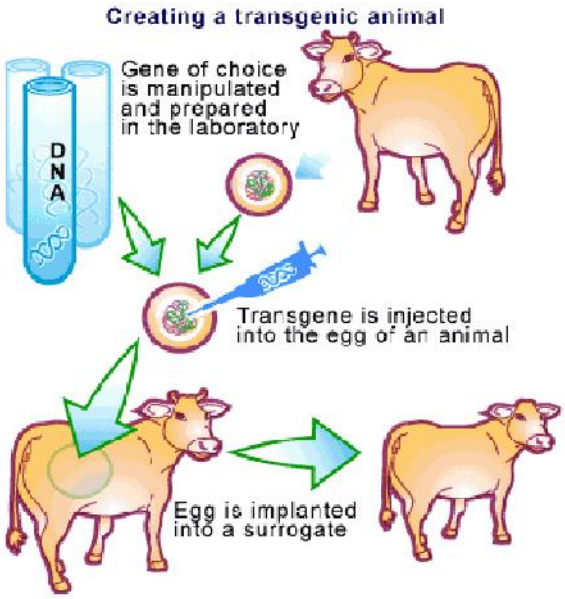
۱) ریزتزریق دزوکسی ریبونوکلئیک (DNA)

این روش که برای تولید حیوانات اهلی ترانس‌ژنیک استفاده شده، برای موش موفقیت‌آمیزتر بوده است و برای گاو که اووسیت کدر و چربی زیاد دارد با مشکل همراه است. این روش شامل ریزتزریق مستقیم یک ژن یا ترکیبی از ژن‌ها از عضو دیگر همان‌گونه یا از گونه‌ای متفاوت، به پیش‌هسته‌ی تخمک بارور شده است. این روش یکی از اولین روش‌هایی است که در جانوران به تأیید رسیده است. DNA وارد شده ممکن است منجر به بیان بالا- یا پایین- ژن‌های مشخص شود و یا سبب بیان یک ژن کاملاً جدید برای آن گونه شود. رسیدن به هدف مطلوب پس از ریز تزریق DNA یک فرایند تصادفی است و احتمال زیادی وجود دارد که DNAای که به پیش‌هسته وارد کرده‌ایم به جایگاه مناسب در DNA سلول میزبان وارد نشود تا امکان بیان آن فراهم گردد. تخمک بارورشده‌ای که میزبان DNA تزریق‌شده است، به لوله‌ی رحمی حیوان ماده منتقل می‌شود. مزیت این روش قابلیت کاربرد آن در طیف وسیعی از گونه‌ها است. اولین قدم برای انجام این روش تهیه‌ی رویان مناسب است. رویان‌های موردنیاز باید ۱۲ تا ۲۴ ساعت عمر داشته باشند و جمع‌آوری آن‌ها از داخل اویدکت با استفاده از ۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی دالبکو انجام می‌شود.

قدم سوم انتقال ژن به سلول تخم تازه بارور شده است؛ برای این کار ۱ تا ۲ پیکولیتر محلول بافر حاوی DNA به داخل پرونوکلئوس تزریق می‌شود و ژن در یک محل تصادفی قرار می‌گیرد.

در عمل ممکن است چندین کپی از ژن جدید در یک موقعیت در کروموزوم قرار گیرد یا اینکه در کروموزوم‌های مختلف پخش شوند.

زمان انجام ریزتزریقی مهم است و بهتر است در اوایل مرحله تشکیل پیش‌هسته‌ها باشد. دیده شده است که انجام ریزتزریقی در اواسط و اواخر مرحله تشکیل پرونوکلئوس‌ها رشد و تکامل رویان‌ها را به تأخیر می‌اندازد. مرحله‌ی بعد انتقال دادن رویان تراریخته به اویدکت حیوان گیرنده است. کمتر از ۱۰ درصد رویان‌های تراریخته‌ی گوسفند و گاو زنده می‌مانند و بقیه در مراحل مختلف می‌میرند. تنها ۱۰ درصد یا کمتر از رویان‌های زنده‌مانده تراریخته هستند و ۳۰ تا ۶۰ درصد نوزادان متولدشده ویژگی‌های موردنظر را نشان می‌دهند. همهٔ ژن انتقال داده شده پس از ریزتزریقی به پیش‌هسته، به ژنوم تمام سلول‌های رویان وارد نمی‌شود و تنها به برخی سلول‌ها وارد می‌شود. در این حالت حیوان دارای وضعیت موزاییک است که غیرطبیعی می‌باشد. به‌طورکلی تولید حیوانات غیرموزاییکی حاصل از ریزتزریقی کم هستند.

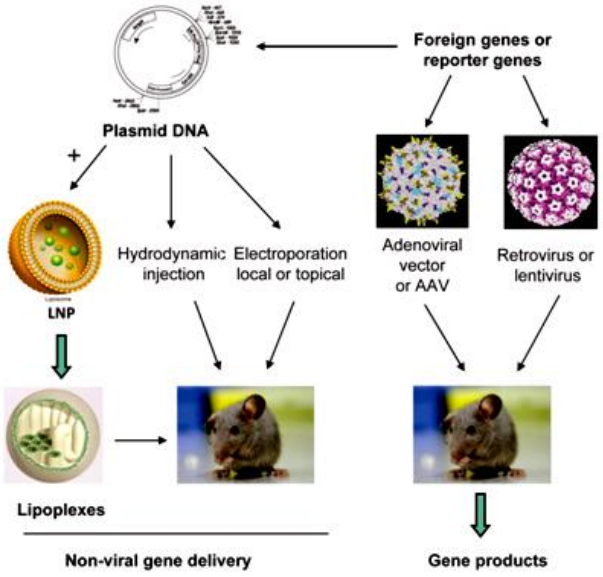


۲) استفاده از رتروویروس‌های نوترکیب

اساس انتقال ژن از طریق ویروس‌ها مبتنی بر انتقال ژن‌های خارجی به داخل جنین‌ها از طریق ویروس‌های نوترکیب است. برای اطمینان از انتقال ترانس‌ژن به سلول‌های دختری و نیز به نسل بعد، لازم است از ویروس‌هایی استفاده شود که به‌طور پایدار وارد ژنوم سلول میزبان شوند. از رتروویروس‌ها به دلیل داشتن همین دو خصوصیت به‌عنوان حامل ترانس‌ژن به داخل جنین استفاده می‌شود (8). استفاده از روش ریزتزریقی برای پرندگان کاربرد ندارد، زیرا رویان آن‌ها در داخل تخم رشد می‌کند، بنابراین روش ناقل‌های رتروویروسی برای آن‌ها بکار گرفته شده است. از این روش برای تولید موش‌های ترانس‌ژنیک نیز به‌خوبی استفاده شده است. روش کار به این صورت است که ژن موردنظر را به یک رتروویروس انتقال داده و سپس رویان را به ویروس نوترکیب آلوده می‌کنند. به موجودات تراریخته‌ای که به این روش تولید می‌شوند Chimeric گفته می‌شود. لنتی‌ویروس‌ها (Lentiviruses)

دسته‌ای از خانواده رتروویروس‌ها بوده که ژنوم و مورفولوژی آن‌ها پیچیده‌تر از دیگر رتروویروس‌هاست (9). لنتی‌ویروس‌ها از حیوانات مختلفی نظیر گوسفند، گاو، اسب، گربه و انسان جدا شده‌اند که معروف‌ترین آن‌ها ویروس HIV انسانی است (10).

در سال ۲۰۰۱ محققین توانستند با همین روش میمون تراریخته را ایجاد کنند که بیان ترانس‌ژن GFP در تمامی سلول‌های آن مشاهده شد (11). از آن به بعد استفاده از این روش برای ایجاد پستانداران تراریخته به‌عنوان یک روش جایگزین روش ریزتزریق افزایش یافت و با ایجاد نسل‌های جدیدتر حامل‌های لنتی‌ویروسی که نرخ ورود و بیان زیادتری داشتند، استفاده از این روش رایج‌تر شد (12). محدودیت اندازه ترانس‌ژن مورداستفاده مهم‌ترین عیب استفاده از این روش در مقایسه با سایر روش‌هاست (13).



۳) انتقال ژن با کمک سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های پایه، سلول‌های تمایزنیافته‌ای هستند که قابلیت تبدیل شدن به هر نوع سلول (سلول سوماتیک یا سلول زاینده) را دارند و بنابراین می‌توانند یک موجود کامل ایجاد کنند. این سلول‌ها سپس با یک جنین در مرحله‌ی بلاستولا (۱۶-۸ سلولی) ترکیب می‌شوند. نتیجه‌ی این عمل یک حیوان کایمری است. روش انتقال ژن با سلول‌های بنیادی جنینی روشی است که معمولاً وقتی هدف، غیرفعال‌سازی برخی ژن‌ها است، انتخاب می‌شود که در اصطلاح به آن روش knock-out می‌گویند. این تکنیک اهمیت ویژه‌ای در مطالعه‌ی فاکتورهای ژنتیکی و عملکرد آن‌ها در فرایند تکوین دارد و معمولاً برای تولید موش‌های knock-out استفاده می‌شود. مزیت این روش این است که اجازه می‌دهد با دقت بالایی جهش تعریف‌شده در ژن توسط نوترکیبی هومولوگ، هدف‌گیری شود.

رویان‌ها در مرحله بلاستوسیست دارای چنین سلول‌هایی هستند و می‌توان آن‌ها را جدا کرده و تکثیر نمود.

در این روش سلول‌های پایه‌ی رویانی را در شرایط برون‌تنی تکثیر کرده و ژن موردنظر را به ساختار DNA آن‌ها انتقال می‌دهند، سپس سلول‌های پایه‌ی رویانی را به درون حفره‌ی بلاستوسیست یک رویان تزریق می‌کنند.

بعد از مدتی سلول‌های پایه‌ی رویانی بخشی از توده سلولی درونی رویان می‌شوند.

۴) انتقال ژن با روش انتقال هسته

این تکنیک شامل انتقال هسته از یک سلول دهنده به یک سلول گیرنده است که به‌طور معمول سلول گیرنده یک تخمک بالغ است که کروموزوم‌های آن حذف شده است. پس از انتقال هسته از سلول دهنده به سیتوپلاسم (سلول گیرنده تخمک)، می‌بایست فعال‌سازی تخمک جهت شروع مراحل جنینی به‌صورت مصنوعی انجام شود. اسپیمن برای اولین بار عنوان کرد با انتقال هسته از سلول‌های تمایزیافته به سلول تخم فاقد هسته، می‌توان فرد جدیدی را ایجاد کرد (14).

برای این منظور سلول‌های سوماتیک از بدن یک حیوان گیرنده گرفته شده و در محیط کشت قرار داده می‌شود،

آنگاه ژن موردنظر به سلول سوماتیک منتقل شده و در ساختار DNA آن جای می‌گیرد، سپس این سلول سوماتیک که دارای DNA نوترکیب است را به یک اووسیت تهی‌شده انتقال داده و پس از شوک الکتریکی و کشت موقت در شرایط برون‌تنی به رحم حیوان گیرنده منتقل می‌کنند. در ایران رویانا اولین گوسفند شبیه‌سازی‌شده خاورمیانه در سال ۲۰۰۶ بود که با استفاده از تکنیک انتقال هسته از سلول‌های فیبروبلاست گوش یک قوچ به درون تخمک‌های بدون هسته‌شده گوسفند ایجاد شد (15).

۵) انتقال ژن با استفاده از اسپرم

SMGT(Sperm mediated gene transfer) بر مبنای توانایی سلول‌های اسپرم در اتـــــــــــصال به مولکول DNA خارجی و وارد کردن آن به درون خود و سپس انتقال این مولکول به تخمک در زمان باروری می‌باشد (۱۶).

انتقال ژن با استفاده از اسپرم در سال ۱۹۸۹ برای موش موفقیت‌آمیز بود. در این روش از سلول‌های اسپرماتوزئید موش به‌عنوان ناقل DNA استفاده شد.

در این روش به ابزار پیشرفته و تخصص بالا نیاز نیست، ولی همراه با روش‌های مکملی مثل لیپوفکشن، REMI و الکتروپوریشن، می‌توان بازدهی را بالا برد.

۶) استفاده از تفنگ پرتاب DNA متصل به ذره

در روش تفنگ پرتاب DNA از دستگاهی استفاده می‌شود که ذرات حاوی DNA موردنظر را به اسپرم یا اووسیت یا سلول تخم پرتاب می‌کند.

از اسپرم‌های حاوی ذرات طلا- DNA برای باروری برون‌تنی اووسیت‌های گاو استفاده شده است.

کاربردهای تاریخت‌زایی:

۱) مدل‌های بیماری

۲) بهبود احشام

۳) Pharming مولکولی

۴) کاربرد پزشکی

هم‌اکنون به‌عنوان مدل‌هایی برای بررسی بیماری‌های انسان استفاده می‌شود (disease model)، امّا به علت کوتاه بودن سن موش نسبت به انسان، چندان مناسب نیست. گفته می‌شود که مدل‌های دامی (گوسفند، گاو، خوک و ...) مناسب‌تر هستند. ژن‌های جهش‌یافته‌ی انسان ممکن است به موش وارد شود و باعث شود آن‌ها هم به بیماری‌های انسانی مبتلا شوند، سپس می‌توان بدون آزمایش بر روی انسان راهکارهای درمانی را طراحی و پیدا کرد.

کاربردهای حیوانات انتقال ژنی

تکنولوژی انتقال ژن دارای کاربردهای متعددی است. تولید فراورده‌های دارویی به همراه شیر حیوانات شیرده، تولید حیوان با ضریب تبدیل غذایی بیشتر یا حیوان با چربی اشباع‌شده کمتر در گوشت، تولید شیر با خاصیت پنیرسازی بیشتر و موارد مشابه این‌ها ازجمله هدف‌هایی است که از طریق تکنولوژی انتقال ژن تعقیب می‌شود. می‌توان دام‌هایی که رشد سریع‌تر و مقاومت به بیماری‌ها دارند و با ارزش غذایی بهتر تولید کرد.

بیوفارمینگ (داروخانه زنده)

تولید تجاری فرآورده‌های دارویی در مایعات بدن حیوانات ترانس‌ژنیک و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها از مدت‌ها قبل مورداستفاده قرار گرفته‌اند. تولید پروتئین‌های نوترکیب برای عدم تشکیل لخته‌های خون در بیماران قلبی و بعد از اعمال جراحی و همچنین تولید ترکیبات دارویی و هورمون‌ها در شیر و خون دام‌ها نظیر انسولین در شیر، اهمیت کاربرد حیوانات تراریخته را بیشتر نموده است.

فارمینگ مولکولی فناوریی است که در آن از حیوانات دامی و محصولات کشاورزی برای تولید دارو و مواد غذایی مفید استفاده می‌شود. گوسفند، بزها و گاوهای تراریخته به‌عنوان بیوراکتورهایی برای تولید پروتئین‌های انسانی با اهمیت در شیر استفاده می‌شوند.

بزهای تراریختی که در شیرشان پروتئین آنتی‌ترومبین (ضد تولید لخته خون) تولید می‌کنند

اهمیت تولید حیوانات تراریخته

۱) مقاومت بیشتر در برابر بیماری‌ها

۲) تولید ترکیبات دارویی در شیر

۳) تولید حیواناتی که قادر به تأمین هموگلوبین انسانی باشند.

۴) تولید حیواناتی که قادر به تأمین اندام‌ها (قلب) برای انسان باشند.

۵) تولید شیر شبیه شیر انسان

۶) تغییر ترکیبات شیر (لاکتوز، لیزوزیم، ...)

۷) افزایش سرعت رشد حیوانات و بازده بیشتر تولید محصول

References:

1. Houdebine LM. Animal Transgenesis and cloning. New York: John Wiley and Sons pub; 2003.

2. Houdebine LM. Animal transgenesis: recent data and perspectives. Biochimie. 2002; 84: 1137-1141

3. Maga EA, Cullor JS, Smith W, Anderson GB, Murray JD. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria

that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3(4): 384-392.

4. Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr Mz, Barney DJ, et al. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nat, Biotechnol. 2001; 19: 741-745.

5. Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. J Dairy Sci. 1997; 80: 2213-2224.

6. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nat. Biotechnol. 2003; 21: 157-162.

7. Noble MS, Rodriguez-Zas S, Bleck GT, Hurley WL, Wheeler MB. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine α-lactalbumin in their milk. J Anim Sci. 2002; 80: 1090-1096.

8. Pfiefer A. Lentiviral transgenesis. Transgenic Research. 2004; 13: 513-522.

9. Fässler R. Lentiviral transgene vectors. EMBO. 2004; 5(1): 28-29.

10. Desrosiers RC. Nonhuman lentiviruses. In: Howley PM, Knipe DM, Griffin D, Lamb RA, Martin A, Roizman B, Straus SE (editors). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 2001.
11. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-San-tos J, Simerly CR, Hewitson L, et al. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. Mol Hum Reprod. 2000; 6: 26-33.
12. Kurita K, Burgess SM, Sakai S. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. PNAS. 2004; 101(5): 1263-1267.
13. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. Nat Genet. 2000; 25: 217-222.
14. Spemann H. Embryonic Development and Induction. New York: Hafner Publishing Co; 1938.
15. Ashtiani K, Nasr-Esfahani MH, Hosseini M, Moulavi F, Hajian M, Frouzanfar M, et al. Royana: Successful Experience in Cloning the Sheep. Yakhteh. 2008; 10(3): 193-200.
16. Churchil RR, Gupta J, Singh DA, Sharma D. Exogenous DNA internalisation by sperm cells is improved by combining Lipofection and Restriction Enzyme Mediated Integration. British Poultry Science 2011;52(3):287-291.