

روش های تولید پرندگان تراریخت و کاربرد آنها در زیست فناوری

محمد رضا نصیری¹، شاهرخ قوتی^{2*}، محمد رضا محمدآبادی³، حمید آریان نژاد²، محمد دوستی²

¹ دانشیار گروه علوم دامی و پژوهشکده بیوتکنولوژی و فناوری زیستی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

² دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

³ دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1388/12/13، تاریخ پذیرش: 1390/02/07

چکیده

طی چند دهه گذشته توانایی ایجاد تغییرات مستقیم ژنتیکی در سطح ملکولی انقلاب عظیمی را در علم زیست شناسی بوجود آورده است. فناوری موجود در تراریختها، امکان پیوند تکنیکهای مختلف را در زمینه-های جنین شناسی، بیولوژی سلولی و ژنتیک ملکولی فراهم کرده است. امروزه پرندگان تراریخت به عنوان ابزارهای تحقیقاتی مفید و مؤثر در بسیاری از مؤسسات مورد استفاده قرار می گیرند. بسیاری از دانشمندان معتقدند که قبل از تحقیق در این مورد، ابتدا باید روش های تولید پرندگان تراریخت متداول شوند. با توجه به پیشرفت چشمگیر علم زیست فناوری، دستکاری مستقیم جنین به وسیله DNA و یا حامل های ویروسی امکان پذیر شده است. اما به طور عموم، این روش ها توانایی ایجاد جایگاه اختصاصی برای دستکاری ژنوم را ندارند. برای رفع این مشکل، اخیراً روش های مختلفی برای تولید جوجه های تراریخت بر پایه استفاده از سلول های بلاستودرم (BDCS)، سلول های بنیادی جنین (ESCs)، سلول های زایای بدوی (PGCS) و سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال (SSCs) پیشنهاد شده و توسعه یافته است. لذا سیستمی کامل برای جداسازی، تکثیر، آلوده کردن، انتخاب و تکثیر مجدد محیط کشت سلول های بنیادی جنینی و به دنبال آن تولید میزان بالایی شمیر سوماتیک بهبود داده شده و نتایج آن در مقالات جدید علمی گزارش شده است. نشان داده شده که روش کشت بیضه ای سلول های اسپرماتوگونیال جدیدترین، ساده ترین و پربازده ترین روش تولید جوجه های تراریخت در طی سالهای اخیر بوده است. در این روش از SSCs ها به عنوان القاگر در مراحل بیولوژیکی تولید اسپرم برای ایجاد جوجه های تراریخت استفاده می شود. اگرچه استفاده از سیستم های ویروسی می تواند باعث انتقال ژن با بازدهی بالا شوند، اما مسائل ایمنی موجود، کاربرد عملی آنها را محدود کرده است. در حال حاضر برای ایجاد پرندگان تراریخت از ترکیب روش های تولید سلول های زایای شمیر و دستکاری سلولی بنیادی پرتوان نیز استفاده می شود. در این مقاله سعی شده مهمترین روش های تولید جوجه های تراریخت، روش های انتقال ژن و همچنین کاربرد جوجه های تراریخت به عنوان راکتور زیستی در زیست فناوری تشریح شود.

کلمات کلیدی: جوجه های تراریخت، انتقال ژن، دستکاری ژنتیکی، سلول های پرتوان، حامل های ویروسی، سلول های بنیادی.

مقدمه

در طی دهه گذشته تحقیقات انجام شده در زمینه‌های داروشناسی، پزشکی، ژنتیک، کشاورزی و مهندسی داروهای زیستی در اکثر کشورهای پیشرفته نیاز به تولید حیوانات تراریخت را اثبات نموده اند. وجود مزیت‌های تکنیکی قابل توجه در پرندگان سبب شده با وجود گزینه‌های مختلف برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب¹، جوجه‌های تراریخت² به عنوان منبع تجاری مهمی برای تولید مورد توجه قرار گیرند. این مزیت‌ها شامل موارد زیر است: 1- دوره رشد کوتاه (متوسط 5 ماه در مرغ‌سانان³)، 2- ردیابی جوجه‌های حاوی ژن انتقال یافته در مدت کوتاه تر (Lillico et al., 2005)، 3- تولید بیشتر ژن انتقال یافته (خروس بارور می‌تواند هر سه روز به ازای ده مرغ منی تولید کند، هر مرغ گیرنده می‌تواند بعد از لقاح ده تخم زایا تولید کند و مرغان بالغ ماده سالانه در حدود 330 تخم تولید می‌کنند) و 4- ساختار ساده پروتئین‌های تخم که به شکل معنی داری در خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب تاثیر مثبت دارد (Dunn et al., 2005). لذا، پرندگان به سبب هزینه تولید کمتر، محیط استریل طبیعی تخم و تولید مقدار زیاد پروتئین در تخم گزینه‌های مناسبی برای تولید پروتئین‌های درمانی در صنعت داروسازی

هستند (Dunn et al., 2005). اگرچه در بیست سال گذشته موش‌های تراریخت بیشتر برای انجام تحقیقات تجاری مورد توجه بوده‌اند، اما تکنولوژی تولید جوجه‌های تراریخت نیز همزمان با پستانداران رشد کرده است. اولین موش تراریخت را Gordon et al., (1980) با استفاده از تکنیک انتقال ژن به پیش هسته⁴ ایجاد کردند. با وجود محدودیت‌هایی همچون انتقال تصادفی و جهش در قطعه انتقال داده شده، که سبب کاهش راندمان تولید تراریخت‌ها می‌شدند، تزریق به پیش هسته به عنوان پرکاربردترین فناوری تولید تراریخت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Ono et al., 1994). تفاوت‌های معنی دار مانند روند عبور تخم از اویداکت، نیاز به پوسته برای رشد و دشواری جداسازی سلول‌های زایا یا بنیادی جنین پرندگان که در سیستم‌های تولیدمثلی گونه‌های پرندگان نسبت به پستانداران وجود دارد، باعث شد که محققین روش‌های متفاوتی را برای تولید پرندگان تراریخت مورد استفاده قرار دهند. در گزارشات قبلی به دو روش عمده برای تولید پرندگان تراریخت اشاره شده است که به دو روش مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می‌شوند. در روش مستقیم، جنین با استفاده از DNA و یا حامل‌های ویروسی دستکاری می‌شود. روش‌های غیر مستقیم مختلفی بر پایه سلولی، برای تولید جوجه‌های تراریخت

1 Recombinant protein

2 Transgene chickens

3 *Gallus gallus*

4 Pronucleus

را دشوار می‌کرد. برای به دست آوردن هر تخم، پرنده‌های بالغ می‌باید ذبح می‌شدند. لذا، تعداد مناسب و کافی تخم برای تولید پرندگان تراریخت بدست نمی‌آمد. همچنین این روش‌ها به مهارت-هایی ویژه‌ای نیاز دارند، زیرا پس از هر تزریق، تخمک باید در خارج از بدن موجود زنده کشت داده شود یا به پرنده ماده دیگری منتقل شود تا نهایتاً یک پرنده زنده متولد شود که هر دوی این روش‌ها به سطح قابل توجهی از مهارت‌های تکنیکی و زیر ساختی برای انجام سیستم کشت خارج از بدن موجود زنده، نیاز دارند. محققان تلاش کردند با دستکاری مستقیم جنین در دو مرحله اساسی رشد این دو مشکل مهم را از بین ببرند. آنها نشان دادند مرحله بلاستودرم (مرحله X)، تخم تازه بارور شده زمان مناسبی برای قرار دادن جنین دستکاری شده می‌باشد (Han, 2009). همچنین انکوبه کردن جنین به مدت 72 ساعت، سبب قابل دسترس شدن سلول‌های زایای بدوی می‌شود که از این سلول‌ها نیز می‌توان برای دستکاری جنین استفاده کرد. در سال 2001، پژوهشگران از طریق انتقال مؤثر سلول‌های زایا (80 درصد) با استفاده از حامل‌های دارای نسخه برداری ناقص رتروویروسی به درون تخم در مرحله بلاستودرم، بلدرچین تراریخت تولید کردند (Mizuarai et al., 2001). برای افزایش بازده بیان ژن و انتقال سلول‌های زایا، پژوهشگران تحقیقات را روی مرحله رشد مناسب رویان برای تزریق حامل-

توسعه یافته‌اند، که در آن‌ها به طور عمده از سلول-های بلاستودرم⁵ (BDCS)، سلول‌های بنیادی جنین⁶ (ESCs)، سلول‌های زایای بدوی⁷ (PGCS) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا⁸ (SSCs) استفاده می‌شود. محققین برای تولید موفقیت آمیز حیوانات تراریخت دو اصل مهم را در نظر گرفته‌اند. اول این که آن‌ها سعی نمودند که سلول-های هدف در حیوانات مختلف را بدون کاهش در قابلیت زیستی سلول به طور مؤثری دستکاری کنند و دوم این که دستکاری ژن هدف سبب تغییر عملکرد نرمال ژن نشود. هدف از این مقاله مروری بر انواع روش‌های انتقال ژن در پرندگان و میزان موفقیت و کارایی این روش‌ها در بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در پرندگان تراریخت و کاربرد آنها در زیست‌فناوری می‌باشد.

روش‌های مستقیم

در مطالعات اولیه، پژوهشگران تلاش کردند که با استفاده از روش‌های مرسوم در پستانداران، پرندگان تراریخت را تولید کنند. محققان در این روش‌ها سعی نمودند با تزریق DNA به پیش هسته تخم، پرنده تراریخت ایجاد کنند (Love et al., 1994; Sherman et al., 1998). استفاده از این روش‌ها علاوه بر هزینه بودن مسایلی را بوجود آوردند، که استفاده از آن‌ها

5 Blastodermal cell

6 Embryonic stem cells

7 Primordial germ cells

8 Spermatogonial stem cell

توانایی دستکاری جایگاه اختصاصی (هدف قرار دادن ژن مشخص) در ژنوم را ندارد. زیرا ژن‌های منتقل شده به صورت تصادفی در کروموزوم‌های میزبان ادغام می‌شوند (Van de Lavoie et al., 2006). یکی دیگر از معایب این روش اثرات ناشی از جایگاه قرار گرفتن ژن انتقال داده شده در کروموزوم می‌باشد که احتمالاً سبب بیان متغیر تراویخت در بدن میزبان می‌شود. به همین دلیل، استفاده از ژن هدف برای تولید پرندگان تراویخت مورد توجه قرار گرفته است. زیرا در این روش احتمال بدست آوردن فنوتیپ قابل پیش‌بینی که از نظر اقتصادی دارای اهمیت می‌باشد نسبت به وجود لاین‌های مختلف از پرندگان که از طریق ادغام تصادفی ژن بدست آمده‌اند، بیشتر است (Dodgson, 2007).

روش‌های غیرمستقیم

در روش انتقال ژن بر پایه سلولی، ژن هدف درون ژنوم قرار می‌گیرد و می‌توان بیان ژن انتقال یافته را قبل از انتقال سلول‌ها به رویان مورد آزمایش قرار داد. این روش اجازه می‌دهد که تراویخت‌هایی با اهداف مختلف تولید شود. اولین قدم در تولید تراویخت‌ها بر پایه سلول، به دست آوردن محیط کشت سلولی مناسب است. از ویژگی‌های این محیط کشت می‌توان به مناسب بودن شرایط برای ورود لاین سلول‌های زایا، آلوده شدن از طریق ساختمان DNA و انتقال سلول‌های

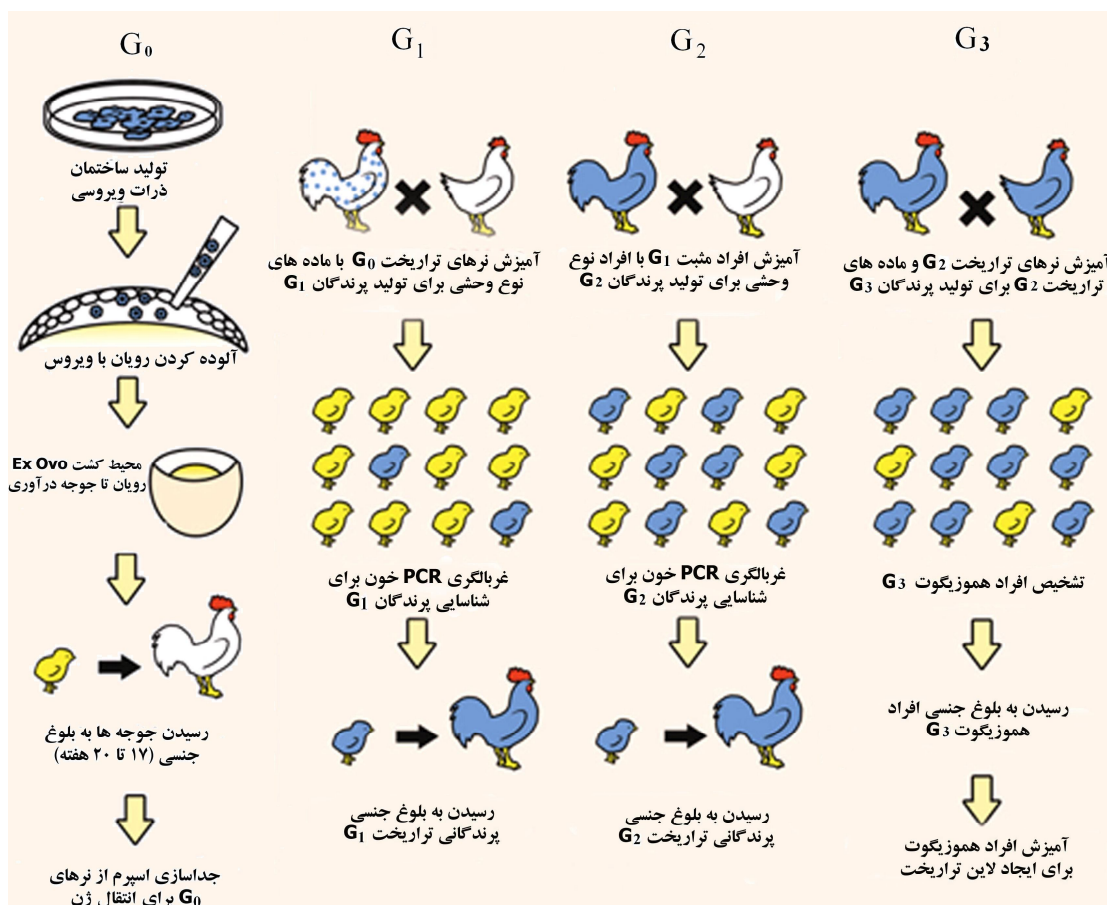
های ویروسی انجام دادند. در جوجه‌ها چندین طبقه از حامل‌های رتروویروسی وجود دارد که در مرحله X به رویان انتقال داده می‌شوند. محققان توانستند حداکثر سطح بیان را با تزریق حامل‌های رتروویروسی دارای نسخه بردای ناقص درون قلب جنین پس از 55 ساعت انکوباسیون، به دست آورند (Masamichi et al., 2005). همچنین در سال 2009، این پژوهشگران گزارش موفقیتی مبنی بر تولید آنتی‌بادی منوکلونال در زرده و سفیده تخم با استفاده از روش تزریق حامل‌های رتروویروسی دارای نسخه برداری ناقص درون قلب جنین پس از 55 ساعت انکوباسیون را ارائه نموده‌اند (Kamihiraa et al., 2009). امروزه مشخص شده است بیشترین بازدهی هدایت و بیان ژن، زمانی است که ویروس‌های محلول در مرحله مناسب (مرحله 14 - 15) به جنین تزریق شوند (Kawabe et al., 2008). این تحقیقات نشان دادند مهاجرت PGCs از جریان خون به گنادها، می‌تواند هدف مناسبی برای تولید جوجه‌های تراویخت توسط حامل‌های رتروویروسی باشد. بنابراین، با استناد به گزارشات قبلی می‌توان گفت رشد مناسب جنین همراه با روش انتقال ژن به وسیله لنتی‌ویروس‌ها یا رتروویروس‌های دارای نسخه برداری ناقص می‌تواند تا حد زیادی باعث بهبود انتقال ژن به پرندگان شود. اگرچه با استفاده از دستکاری مستقیم جنین به وسیله DNA یا حامل‌های ویروسی می‌توان جوجه‌های تراویخت تولید کرد، اما این روش

شدند (Eyal-Giladi & Kochav, 1976). پژوهشگران بسیاری با استفاده از سلول‌های بلاستودرم در مرحله X، سلول‌های زایای شیمر تولید کرده‌اند (Carsience et al., 1993; Maeda et al., 1997; McGrew et al., 2004). آن‌ها پیشنهاد کردند که مرحله X رویانی بهترین مرحله برای تولید جوجه‌های شیمر می‌باشد زیرا رویان در این مرحله دارای تعداد زیادی سلول با مورفولوژی تمایز نیافته است. همچنین این تحقیقات نشان دادند که سلول‌های بلاستودرم علاوه بر حفره جنسی، در درون زرده نیز به مقدار زیادی وجود دارند (Maeda et al., 1997). سلول‌های بلاستودرم به عنوان محرک‌های ایجاد سلول‌های سوماتیک و سلول‌های زایای شیمر مورد استفاده قرار می‌گیرند. با تابش پرتوی گاما و یا حذف قسمت مرکزی سلول‌های بلاستودرم راندمان تولید شیمر بالا می‌رود (Carsience et al., 1993; Kagami et al., 1997). تحقیقات نشان می‌دهند سلول‌های بلاستودرم برای انتقال ژن با استفاده از روش‌های مختلف، مثل لیپوزوم‌ها و رتروویروس‌ها نیز مناسب می‌باشند (Kamihiraa et al., 2005; Wang et al., 2006). گزارش شده است تزریق به مرکز گیرنده سلول‌های بلاستودرم باعث ایجاد رویان‌هایی با سرهای غیرنرمال می‌شود (Maeda et al., 1997). مهمترین مشکل این روش نرخ پایین تولید شیمر می‌باشد.

آلوده به داخل رویان اشاره کرد. سپس فرزندان نسل G_0 با جوجه‌های نسل G_1 که تراریخت را حمل می‌کنند آمیزش داده می‌شوند (شکل 1). برنامه این تکنیک تلاش می‌کند تا سه فناوری مهم: الف) توانایی سلول‌های کشت شده که بتوانند به داخل سلول‌های زایا وارد شوند، ب) رشد ساختمان مناسب DNA و ج) توانایی تولید سلول‌های پیش-ساز گامت شیمر را با هم هماهنگ کند. در سال 1990 اولین جوجه‌های تراریخت با سلول‌های زایایی شیمر تولید شدند و به دنبال آن، تولید طیور با سلول‌های زایای شیمر به روشی متداول و عمومی تبدیل شد (Bednarczyk et al., 2000; Speksnijder & Ivarie, 2000; Li et al., 2008).

استفاده از سلول‌های بلاستودرم در تولید پرندگان تراریخت

در جوجه‌ها، لقاح یک ساعت بعد از تخمک اندازی صورت می‌گیرد و رشد رویان سه ساعت بعد از آغاز آمیخته شدن پیش‌هسته‌های نر و ماده شروع می‌شود (Perry, 1988). اولین تقسیم دو ساعت به طول می‌انجامد و تخمک وارد غده پوسته می‌شود. پوسته در طول 18-20 ساعت تشکیل می‌شود و تخم در این شرایط حاوی 40000 تا 80000 سلول با مورفولوژی تمایز نیافته است. این مراحل توسط ایبال-گیلادی و کوواج در سال 1976 به نام سلول‌های مرحله X نامگذاری



شکل 1- گام های اصلی و اساسی در تولید و ایجاد لاین ترا ریخت. در این نمونه از حامل ویروسی استفاده شده است. با این حال، روش های دیگر مشابه این مراحل می باشند. برای ساخت نسل G₀، ساختمان ویروس باید تولید شود و رویان ها به وسیله آنها آلوده شوند. رویان ها در محیط کشت *Ex Ovo* کشت داده می شوند، جوجه ها متولد می شوند و بعد از آن تا زمان بلوغ جنسی برای جداسازی موزائیک ها پرورش داده می شوند. ساخت نسل 1 تا 3 نیاز به زمان، هزینه و امکانات زیادی برای ایجاد و مشخص کردن لاین ترا ریخت دارد (Mozdziak & Petite, 2004).

Figure 1 - General steps in the production and establishment of a transgenic chicken's line. The viral vectors were used as an example illustrates. However, the process is similar to other methods. Generation 0 (G₀) involves the construction and production of virus and the infection of embryos followed by *Ex Ovo* culture, hatching, rearing, and screening of putative mosaics for breeding. Generations 1–3 (G₁–3) require the majority of time, cost, and facilities to establish and characterize a usable line of birds (Mozdziak & Petite, 2004).

(هلال جنینی) منتقل می‌شود. بین مرحله 10 و 12، PGCsها از هلال جنینی به سمت جریان خون حرکت می‌کنند. آن‌ها تا زمانی که به برآمدگی جنسی نرفته‌اند، در سیستم جریان خون باقی می‌مانند (Motono et al., 2010). این سلول‌ها از طریق گردش خون جنین به قسمت تاج گنادهای مهاجرت می‌کنند و به گنادهای بالغ تبدیل می‌شوند (Nakamura et al., 2007). قابلیت منحصر به فرد PGCs، که سبب انتقال از طریق جریان خون و تسهیل تولید سلولهای زایای شیمری از طریق تزریق آلوژنیک و یا اگزوژنیک می‌شود به تولید سلول‌های پرتوان می‌انجامد. سلولهای زایای شیمری با جمع آوری PGCs از خون رویان در طول مرحله 17-13 تولید می‌شوند و سپس به رویان‌های گیرنده تزریق می‌شوند. میزان انتقال سلول‌های زایای شیمری در این روش نسبت به سلول‌های بلاستودرم بیشتر می‌باشد (11/3 تا 96 درصد). پژوهشگران در سال 2004 گزارش کردند که بیشتر تلاش‌ها برای کشت سلول‌های بنیادی رویانی پرنده‌گان، بر روی مرحله X بلاستودرم یا PGC می‌باشد (شکل 2).

در آزمایشی از 184 تخمی که رویان به آن انتقال داده شده بود، 41 جوجه متولد شدند که فقط شش جوجه شیمری بودند (Ono et al., 1994). سلول‌های بلاستودرم پرنده‌گانی که در محیط آزمایشگاهی کشت داده شده‌اند نمی‌توانند بیش از یک هفته در سلولهای زایای‌های شیمری حضور داشته باشند. از آنجایی که سلول‌های بلاستودرم قابلیت تمایز دارند، تعدادی از محققان تلاش کردند تا از این سلول‌ها به عنوان پیش‌ساز سلول‌های ESCs استفاده کنند (Pain et al., 1996).

ویژگی‌های سلول‌های زایای بدوی برای تولید پرنده‌گان تراریخت

سلول‌های زایای بدوی (PGCs) سلول‌های پیشرو تولید گامت هستند و در پرنده‌گان می‌توان آن‌ها را به وسیله جدا کردن ناحیه هلال جنسی، که محل انباشتگی این سلول‌هاست و یا گرفتن نمونه خون در زمان مهاجرت این سلول‌ها بدست آورد (Vick et al., 1993). مهاجرت PGCs در پرنده‌گان با پستانداران تفاوت دارد (جدول 1). در پرنده‌گان ابتدا PGCs در اپی‌بلاست⁹ تولید می‌شود و در مرحله X در مرکز پلوسیدا¹⁰ قرار می‌گیرد (Eyal-Giladi & Kochav, 1976). پس از 18 تا 19 ساعت انکوباسیون به هیپوبلاست¹¹ ناحیه پلوسیدا

9 Epiblast

10 Pellucida

11 hypoblast

جدول 1- الگوی مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در پرندگان و پستانداران.

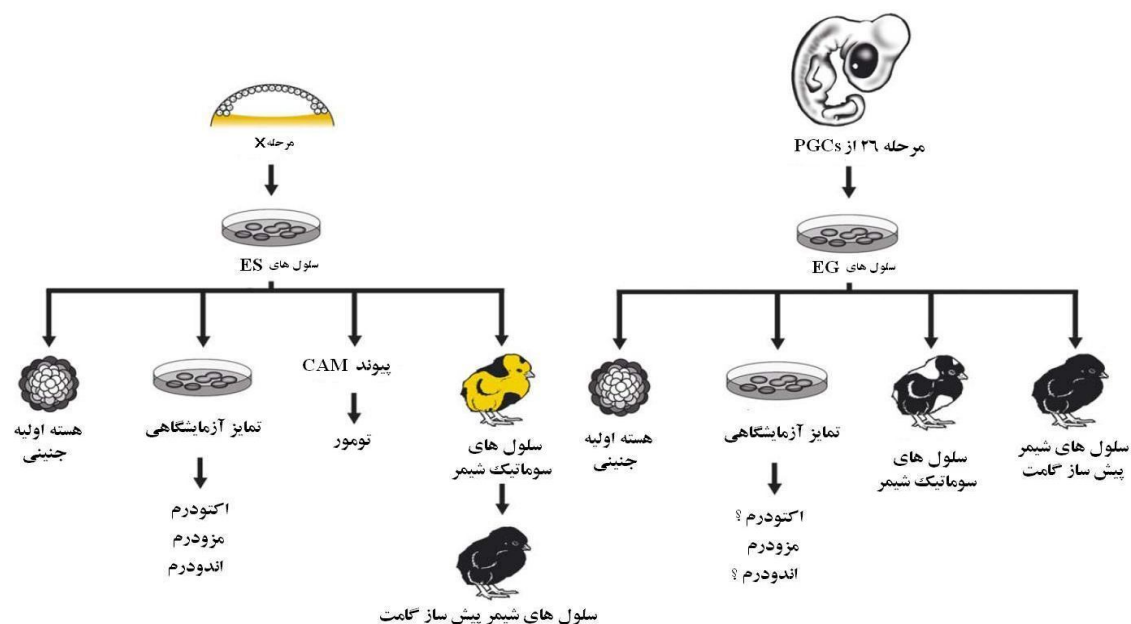
Table 1 - Pattern of primordial germ cells migration in poultry and mammals.

مراحل EG & K ^a , H & H ^b Stages H & H ^b , EG & K ^a	پرندگان (جوجه) Birds (chicken)
مرحله X Stage X	ناحیه مرکزی پلوسیدا <i>Central region of area pellucida</i>
مرحله 4 Stage IV	هلال ژرمینال (جنسی) <i>Germinal crescent</i>
مرحله 10-17 Stage X-IVX	حرکت و گردش در رگ‌های خونی خارج رویانی <i>Move and circulate in extra-embryonic blood vessel</i>
مرحله 20-26 Stage XX-XXVI	مهاجرت و قرار گرفتن در گنادهای رویان <i>Migration and colonization into embryonic gonad</i>
جوجه درآوری Haehabilty	تفکیک و تمایز به اندام‌های جنسی <i>Separation and differentiation to sex organ</i>
روز جنینی Embryonic Day	پستانداران (موش) Mammalian (Mice)
E6-6.5	از اپی‌بلاست تولید می‌شود <i>First arise from epiblast</i>
E7-7.5	ابتدا در بخش پسین کانال هاضمه جنینی، دیده می‌شود. <i>First seen at region of forming hindgut</i>
E9.5	ناحیه قبل را ترک و به برآمدگی تناسلی مهاجرت می‌کند. <i>Leave hindgut and migration to urogenital ridge</i>
E11.5	به برآمدگی genital مهاجرت می‌کند. <i>Migration to genital ridge</i>
تولد Birth	تفکیک و تمایز به اندام‌های جنسی <i>Proliferation or differentiation in sex organ</i>

a) Eyal-Giladi & Kochav

b) Hamburger & Hamilton

PGCs در هر دو گونه از اپی‌بلاست نشأت می‌گیرد اما دارای مسیرهای مهاجرتی متفاوتی در دو گونه می‌باشد (Cherentaeva et al., 2008, Petite) (et al., 2004).



شکل 2- منشا سلول های پرتوان بنیادی رویان در جوجه ها. سلول های بنیادی رویان در مرحله X رویانی از طریق هسته اولیه جنین، تمایز آزمایشگاهی و از طریق تومور وقتی که به CAM¹² پیوند زنده شده باشند، قابل تشخیص هستند. هنگامی که ESCs به رویان گیرنده مرحله X تزریق می شوند آنها می توانند سبب افزایش لاین شیمری سلول های بنیادی و زایا شوند. سلول های زایای بدوی از مرحله 27 رویان می توانند به عنوان سلول های زایایی رویانی کشت داده شوند. این سلول ها می توانند از هسته اولیه جنین، تمایز آزمایشگاهی و شیمری بنیادی و سلول های شیمری پیش ساز گامت نسبت به مرحله جنین گیرنده برای کشت جدا شوند (Petitte et al., 2004).

Figure 2 - The origin of embryonic pluripotent stem cells in the chick. Embryonic stem cells established from stage X embryos can form embryoid core bodies, differentiate in vitro, and form tumor when grafted on the CAM. When ESCs are injected into recipient stage X embryos, they can give increase to somatic/germ line chimeras. Primordial germ cells from the stage 27 embryo can be cultured as embryonic germ cells. Primordial germ cells can derived for culturing form earliest embryoid core bodies, differentiate in vitro, and form somatic chimeras or germ line chimeras depending upon the stage of the recipient embryo (Petitte et al., 2004).

¹² chorioallantoic membrane

حامل لنتی ویروسی، نسل تراریخت ایجاد کنند (Motono et al., 2010). برای افزایش راندمان انتقال سلولهای زایا و تغییرات ژنتیکی، محققان سه روش استفاده از امولسیون بوسولفان¹³ برای غیرفعال کردن PGCs اندوژنوس، حذف با جراحی قسمت مرکزی ناحیه پلوسیدا و استفاده از تابش اشعه ایکس و یا گاما به تخم پذیرنده را پیشنهاد کرده اند (Furuta & Fujihara, 1999; Kagami et al., 1997; Lim et al., 2006)

توانایی‌های سلول‌های بنیادی اسپرم

در پژوهش‌های گذشته، به مقدار زیادی از سلول‌های بلاستودرم، سلول‌های بنیادی جنین و سلول‌های زایای بدوی برای تولید پرندگان شیمیر استفاده می‌شد و القاگرهای انتقال سلولهای زایا، از رویان توسعه یافته جوجه بازیافت می شدند. این روش‌ها بسیار دشوار و زمان بر بودند، زیرا همه آن‌ها به تولید تعداد زیادی حیوان تراریخت نیاز دارند و این حیوانات باید تا زمان بلوغ جنسی برای آزمون‌های مولکولی و تلاقی آزمون (تست کراس) نتاج بدست آمده از جنین‌های دستکاری شده، نگهداری شوند (Li et al., 2008). همچنین بازیافت مجدد PGCs از رویان هنوز ناکارآمد می‌باشد و دستورالعمل این روش از نظر تکنیکی دارای مشکل می‌باشد. از این رو در سالهای اخیر پژوهشگران روش SSCs را برای تولید پرندگان

دانشمندان نشان داده‌اند PGCs جدا شده می‌تواند به دیگر گیرنده‌های رویان، در مرحله‌ای که PGCs در خون در حال گردش است انتقال یابند (Mozdziak et al., 2006). بنابراین راه دیگر برای تولید شیمرها، انتقال ژن به PGCs و سپس اتصال آن به جنین‌های گیرنده است. از آنجاکه PGCs منشاء اسپرم و تخمک می‌باشند انتظار می‌رود بازدهی انتقال به سلولهای زایای بالاتر باشد. همچنین کشت آزمایشگاهی PGCs سبب افزایش راندمان انتقال سلولهای زایای می‌شود. (Van de Lavoie et al., 2006) سیستم قدرتمندی را ارائه کردند که از طریق آن PGCsها می‌توانند برای مدت طولانی در محیط کشت باقی بمانند، در حالی که توانایی تبدیل شدن به سلولهای زایا را همچنان حفظ کنند. با این حال مقدار PGCs که از خون جنین بدست می‌آید (به میزان کمتر از 0/05 درصد از کل سلول‌های خون) مهمترین و اصلی‌ترین محدودیت تکنیکی استفاده از PGCs برای انتقال ژن می‌باشد (Park et al., 2003). برای از بین بردن این محدودیت محققان پیشنهاد کردند که PGCs را از گندهای جنین جدا کنند. در سال 1994 پژوهشگران توانستند برای اولین بار PGCs را از گناد 5 روزه جدا کنند (Allioli et al., 1994). گروهی از پژوهشگران به طور مستقیم بازدهی PGCs را در جنین‌های 2/5 و 5 روزه از نظر مهاجرت به گندهای دریافت کننده، مقایسه کردند و موفق شدند با استفاده از gPGCs آلوده شده با

سلول‌های پرتوان تنها با استفاده از تشخیص آزمایشگاهی از بیضه‌های بالغ بدست می‌آید و سپس به طور مستقیم به بیضه‌های بالغ تزریق می‌شود. بنابراین، نیاز به بازیابی سلول‌های PGCs نیست و زمان برای آزمون‌های مولکولی و تلاقی آزمون کاهش پیدا می‌کند. همچنین سیستم کشت بیضه‌ای در مقایسه با کشت رویانی، به مدت زمان کمتری نیاز دارد و می‌توان شیمیری مشابه سیستم کشت رویانی تولید کرد. در برخی از تحقیقات سیستم رتروویروسی برای دستکاری ژنتیکی SSCs مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً حامل‌های لنتو-ویروسی نیز برای تولید موش‌ها و خرگوش‌های تراریخت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Park, 2007). در سال‌های اخیر روشی با بازدهی بالا برای جداسازی، خالص‌سازی و کشت SSCs در شرایط آزمایشگاهی توسط پژوهشگران طراحی شده است (Park, 2007). همچنین پژوهشگران نشان دادند که سلول‌های بیضه جوجه می‌تواند به طور مؤثری در آزمایشگاه با یک حامل رتروویروسی گزارشگر دارای نسخه برداری ناقص، که توسط گلیکوپروتئین (VSV-G)¹⁴ سطح آن پوشیده شده است، آلوده شوند (Borwompinyo et al., 2005). محققان با استفاده از اطلاعات بدست آمده، SSCs آلوده شده را به شکل مستقیم به بیضه خروس منتقل کردند و جوجه‌های تراریخت با بازدهی بالایی تولید کردند (Li et al.,

تراریخت مورد توجه قرار داده‌اند. سیستم کشت بیضه‌ای از سلول‌های سوماتیک اسپرماتوگونیا در موش برای اولین بار در سال 1994 پیشنهاد شد (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994). پس از آن مطالعات روی موش نشان داد که سلول‌های بیضه دارای بخشی کوچکی از SSCs هستند که می‌توانند منشاء اسپرماتوزنوسیز باشند (Hamra et al., 2005; Kanatsu-Shinohara et al., 2003). به دنبال آن پژوهشگران توانستند SSCs را در سلول‌های بیضه پرندگان شناسایی کنند (Jung et al., 2007). به طور کلی PGCs داخل گندهای رویانی می‌باشد و در حیوانات نر، درون اسپرماتوگونیا بیضه انتقال می‌یابد. سیستم کشت بیضه از مراحل بیولوژیکی تولید اسپرم بهره برده و از SSCs به عنوان القاگر در جوجه‌های تراریخت استفاده می‌کند. میزان تولید اسپرم به SSCs بستگی دارد که سهم کوچکی از سلول‌های بیضه را شامل می‌شوند اما دارای نقش بسیار مهمی می‌باشند. تعداد سلول‌های SSCs در بیضه‌های جوجه‌ها به شدت با افزایش سن تغییر می‌کنند. این روش می‌تواند در بیضه وضعیت شیمیر موضعی ایجاد و حیوانات تراریخت هموزیگوت در نسل G₁ تولید کند. پژوهشگران اعتقاد دارند انتقال مناسب ژن به درون مخلوطی از سلول‌های بیضه اولیه که ممکن است هدفش SSCs باشد، مسیر تولید پرندگان تراریخت را هموارتر می‌کند (Lee et al., 2006). در این روش لاین

14 Vesicular stomatitis virus envelope glycol-protein

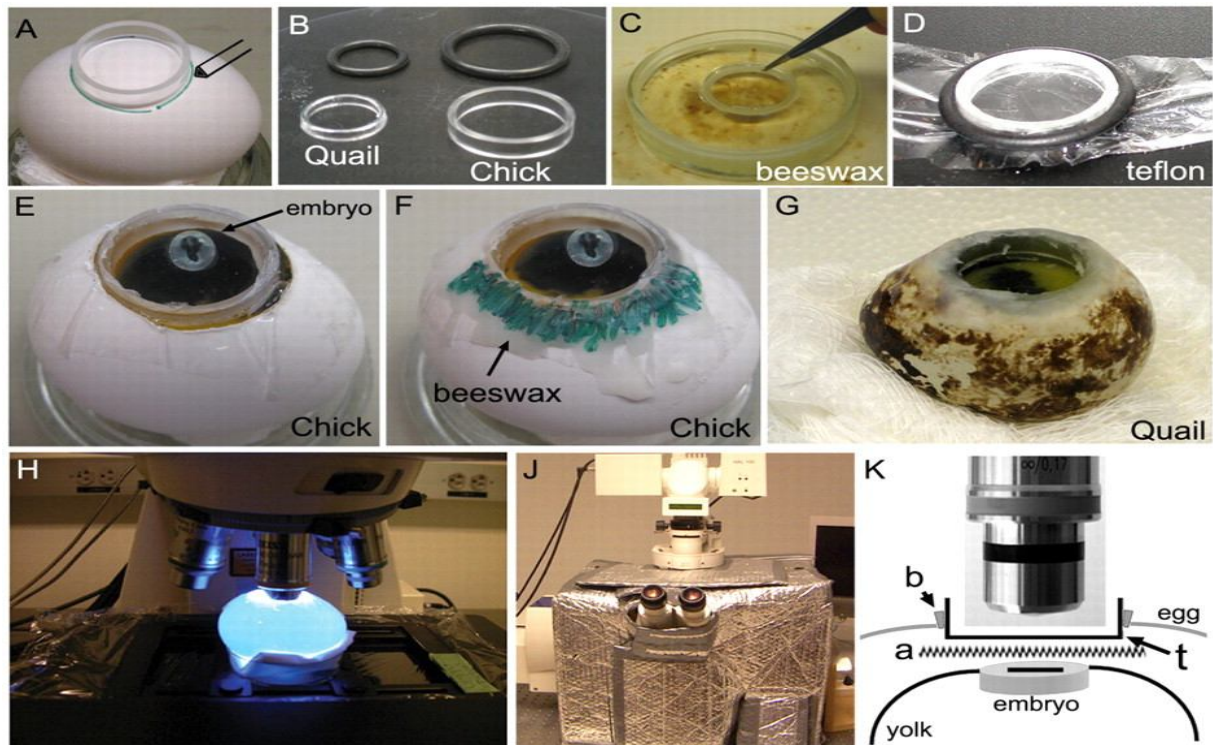
پوسته و پوشاندن پنجره با استفاده از PBS¹⁵ بهبود پیدا کرد. بعد از آن محققان غشای پوسته را در حالیکه تحت تاثیر PBS بود، برش دادند و سلول‌ها را درون رویان تزریق و تخم را توسط غشا پوسته و چسب Duce مهر و موم کردند (Speksnijder & Ivarie, 2000). قابلیت جوجه‌درآوری روش پنجره‌ای با استفاده از این عمل از 6 درصد به 30 درصد افزایش یافت. با تزریق رتروویروس‌ها در روش پنجره‌ای قابلیت جوجه‌درآوری 23 تا 35 درصد بهبود یافت (Harvey et al., 2002a). همچنین قابلیت جوجه‌درآوری با انکوبه کردن تخم‌ها برای 5-7 روز قبل از تزریق سلول‌ها به قسمت انتهایی تخم، افزایش یافت (Bednarczyk et al., 2000). یکی دیگر از موارد مورد توجه در روش پنجره‌ای، استفاده از سیستم کشت Ex Ovo مایع تازه تخم می‌باشد (Perry, 1988). به طور خلاصه، در این روش محتوای مایع تازه تخم در پوسته تخم جوجه‌ها قرار داده می‌شود و رویان‌ها توسط حامل مناسب تزریق می‌شوند. قسمت جدا شده پوست تخم جوجه‌ها با Saran-Warap به مدت سه روز پوشیده می‌شود. به دنبال آن رویان جوجه‌ها داخل قسمت جدا شده از پوسته تخم که با Handi-warp قبل از جوجه‌درآوری پوشیده شده، منتقل می‌شود.

(2008). پژوهشگران دیگری نیز SSCs را از بافت بیضه جنین جدا کردند و آن‌ها را برای بیشتر از 2 ماه بعد از خالص‌سازی در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند. علاوه بر این، آن‌ها دریافتند که SSCs منتقل شده می‌توانند در غشای بازال قرار گرفته، تکثیر شوند و به اسپرم تمایز یابند (Yu et al., 2010). این روش ساده و مؤثر، مسیر جدیدی برای تولید جوجه‌های تراریخت در مقیاس بالا فراهم کرده است. تمامی این مطالعات نشان می‌دهند که روش عملی برای تولید پرندگان تراریخت استفاده از SSCs می‌باشد.

دستکاری رویان

یکی از بزرگترین مشکلاتی که برای تولید جوجه‌های تراریخت با استفاده از روش‌های مختلف وجود دارد، دستکاری رویان برای وارد کردن ژن خارجی درون سلول‌های جرملاین می‌باشد. در گذشته پنجره‌ای کوچک در پوسته تخم ایجاد و بعد از دستکاری رویان، پوسته با یک ماده چسبنده مهر و موم می‌شد در نتیجه قابلیت جوجه‌درآوری با استفاده از این روش قدیمی و ساده بسیار پایین بوده است (شکل 3) (McGrew et al., 1990; Petite et al., 2004). قابلیت جوجه‌درآوری مناسب تخم‌های پنجره‌دار برای تولید پرندگان تراریخت کارآمد، بسیار مهم است. قابلیت جوجه‌درآوری تخم دستکاری شده با خرد نکردن

15 Phosphate Buffered Saline



شکل 3- روش کشت رویان با استفاده از ایجاد پنجره در پوسته تخم. شکل‌های A تا G مراحل نشانه گذاری محل پنجره بر روی تخم و ساخت یک غشای تفلون که با استفاده از آن می‌توان در داخل رویان را مشاهده نمود نشان می‌دهد. (A) حلقه پلاستیکی بر روی محل قرارگیری رویان قرار داده شده و این وضعیت نشانه گذاری می‌شود. (B) اندازه حلقه با اندازه تخم و یا رویان در ارتباط است. حلقه‌های پلاستیکی و حلقه‌های لاستیکی برای بلدرچین و جوجه‌ها مناسب هستند. (C) حلقه‌ها در داخل موم ذوب شده غوطه ور می‌شوند. (D) سپس حلقه‌ها بر روی غشای تفلون قرار داده می‌شود. حلقه لاستیکی بر روی حلقه پلاستیکی قرار گرفته و سبب محافظت بیشتر محیط داخل تخم می‌شود. (E) بعد از شکل دادن و برش مناسب غشای تفلونی، حلقه بر روی قسمت بالای رویان قرار می‌گیرد. (F) موم ذوب شده در اطراف حلقه پلاستیکی ریخته می‌شود. (G) مرحله (F) را در تخم بلدرچین نشان می‌دهد. (H) تخم در زیر میکروسکوپ قرار داده می‌شود (با رنگ آبی روشن شود). (J) میکروسکوپ با اتاقک گرمایی پوشیده می‌شود. (K) مسیر مشاهده در میان پنجره تفلونی که شامل غشای تفلون می‌باشد. (t) مایع بالایی آلبومین و محلول رینگر، (a) قسمت بالایی رویان بر روی سطح زرده می‌باشد و (b) موم می‌باشد. (Kulesa et al., 2010).

Figure 3 - Embryo culture method using a window in the eggshell. (A-G) In Ovo imaging begins with marking the position of the presumptive window in the eggshell and creating a Teflon membrane that will fit into the window to provide an optical pathway to the embryo. (A) An acrylic ring is placed over the embryo and its position is marked. (B) The ring diameter can vary depending on the size of the egg or embryo. Acrylic rings and rubber O-rings appropriate for quail and chick eggs are shown. (C) An acrylic ring is dipped into melted beeswax before (D) being placed onto a Teflon membrane and secured in place with a rubber O-ring around its circumference. (E) After stretching and cutting the Teflon to fit tightly over the acrylic ring, the ring is placed into the hole in the eggshell over the embryo (the embryo contrast has been adjusted to better visualize its position). (F) Warmed beeswax (highlighted in green) is spread around the ring to seal it into the eggshell. (G) The same method applied to a quail egg. (H) The egg is placed on the microscope stage under the objective, which is (J) surrounded by a heated chamber. (K) The optical pathway through the Teflon window includes the Teflon membrane (t), laid above the albumen and Ringer's solution (a) that sits over the embryo on top of the yolk surface; (b) beeswax (Kulesa et al., 2010).

جوجه‌های تراریخت بسیار متداول می‌باشد (Harvey et al., 2003a; McGrew et al., 2004; Mozdziak et al., 2003). حامل‌های رتروویروسی، ویروس‌هایی دارای ژنوم RNA کوچکی هستند که درون یک هسته پروتئینی حاوی اینتگراز¹⁸، آنزیم رونویس معکوس و پروتئاز قرار دارند. پروتئین‌های باند شونده ویروسی گیرنده‌های ویژه بر روی سلول‌های میزبان را گسترش می‌دهند و ذرات ویروسی توسط اندوسیتوز گیرنده‌های میانی به سیتوپلاسم سلولی منتقل می‌شوند. RNA به cDNA کپی شده و به داخل هسته انتقال داده می‌شود و cDNA توسط فعالیت اینتگراز بر روی توالی‌های تکراری انتهایی ویروسی با DNA سلول میزبان ادغام می‌شود. DNA پیش‌ویروسی می‌تواند به RNA ویروسی برای سنتز پروتئین‌ها رونویسی شود که این عمل شامل پلی‌مراز¹⁹ (pol)، آنتی‌ژن‌های پیوسته گروهی²⁰ (gag) و پروتئین‌های توسعه دهنده²¹ (env) می‌باشد. این سه رده پروتئینی هسته ویروسی جدیدی را گردآوری کرده و ژنوم RNA ویروسی را بسته‌بندی می‌کنند. این بسته جدید پیچیده به داخل سلول‌های غشاء میزبان منتقل شده و سپس به خارج از سلول انتقال داده می‌شوند. روش استفاده از این ویروس‌ها بدین گونه است که قسمت‌های غیرضروری و بیماری‌زای ژنوم ویروس

تغییرات ایجاد شده توسط محققین در روش اصلی سبب شد قابلیت جوجه‌درآوری هنگامی که از رتروویروس‌ها استفاده می‌شوند 20 تا 35 درصد افزایش یابد (Perry, 1988; Rowlett & Simkiss, 1987). در تحقیقی خروس‌های G₀ با استفاده از رتروویروس‌ها تولید شدند که دارای قابلیت جوجه‌درآوری مناسبی بودند. این خروس‌ها ژن lacZ را در منی خود حمل می‌کردند (Mozdziak et al., 2003). در حال حاضر روش پنجره‌ای و محیط کشت Ex Ovo تنها روش‌هایی هستند که می‌توان با استفاده از آن‌ها DNA بیگانه را درون رویان جوجه‌ها منتقل کرده و فرزندان زیست‌پذیری بوجود آورد.

روش‌های انتقال ژن

روش‌هایی که برای ایجاد پرندگان تراریخت استفاده می‌شوند بیشتر به منظور انتقال ژن‌های خارجی درون سلول‌های هدف می‌باشند. در این روش‌ها بیشتر از رتروویروس‌های مرغی استفاده می‌شود. حامل‌های نسخه برداری ویروس لکوسیز مرغی¹⁶ و حامل‌های نسخه برداری ناقص بدست آمده از ویروس رتیکولوندوتلوسیز¹⁷ برای این روش‌ها بهینه شده‌اند (Bosselman et al., 1989a; Bosselman et al., 1989b; Salter et al., 1986). روش انتقال ژن رتروویروسی برای تولید

18 Integrase

19 Polymerase

20 Group-associated antigens

21 Envelope

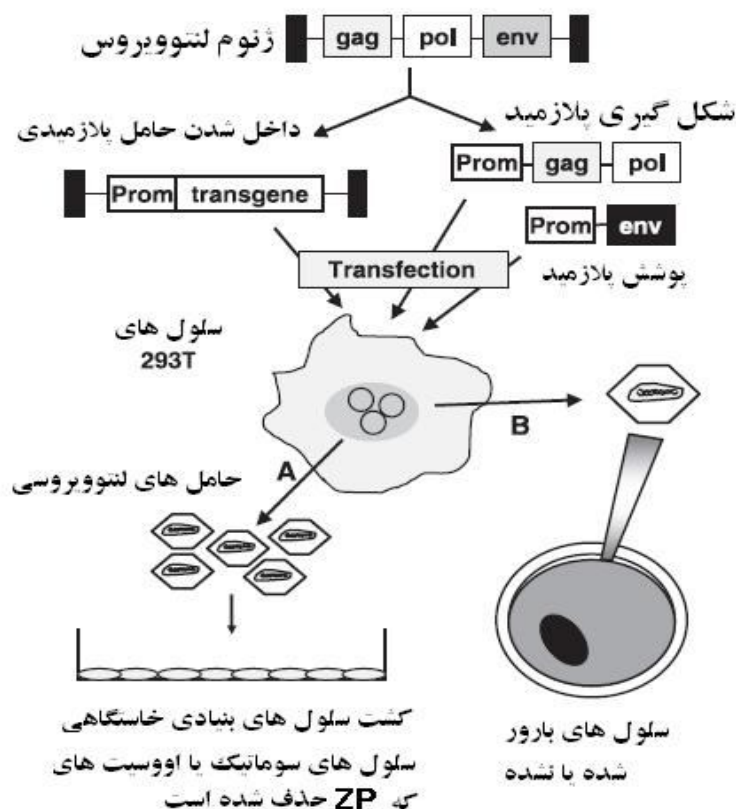
16 Leucosis

17 Reticuloendotheliosis

های لنتی ویروسی برای ادغام شدن نیاز به تقسیم سلولی ندارند، زیرا انتقال اطلاعات ژنتیکی آنها درون سلول میزبان مستقل از تقسیم سلولی بوده و همچنین آنها طیف گسترده‌ای از سلول‌های میزبان را مورد هدف قرار می‌دهند (Cockrell & Kafri, 2007). این حامل‌ها با راندمان بالایی با ژنوم میزبان ادغام می‌شوند به خصوص در سلول‌هایی که فعالیت ندارند. ساختار ژنتیکی و کاربردهای پیچیده حامل‌های لنتوویروسی در شکل 4 توضیح داده شده است.

این روش ابزار نیرومندی برای بیان ژن‌های مطلوب انتقال یافته در بافت اختصاصی یا حذف مستقیم ژن‌های نامطلوب در پرندگان می‌باشد. بعد از استفاده اولیه از لنتوویروس‌ها، کلاس‌های مختلفی از حامل‌های لنتوویروسی برای تولید پرندگان تراریخت مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد، فراوانی تولید تراریخت‌ها با استفاده از این روش 10 تا 100 برابر بیشتر از تراریخت‌های به دست آمده با استفاده از روش‌های قبلی می‌باشد (Chapman et al., 2005; Mottono et al., 2010). علاوه بر این، تا به امروز خاموش شدن ژن یا از دست دادن بیان تراریخت در طول زمان و یا نسل‌ها به ندرت گزارش شده است.

با قطعه مورد نظر جایگزین شده و سپس ویروس به سلول میزبان انتقال داده می‌شود و با ژنوم میزبان ادغام می‌گردد. تا به امروز تحقیقات بسیاری روی تولید جوجه یا بلدرچین تراریخت با استفاده از حامل‌های رتروویروسی با موفقیت همراه بوده است (Harvey et al., 2002a; Harvey et al., 2002b). وجود محدودیت‌هایی از قبیل طول قطعه معرفی شده (کمتر از 8 kb)، ادغام ژن انتقال یافته (تنها درون سلول‌های تقسیم شده)، تشخیص سلول‌های هدف خاص و حساسیت بالا به خاموش شدن ژن سبب افزایش استفاده از حامل‌های لنتوویروسی شده است. حامل‌های لنتوویروسی که از ویروس کم خونی عفونی اسب مشتق شده‌اند، می‌توانند به منظور انتقال ژن به سلول‌های زایا در مرغ‌ها مورد استفاده قرار گیرند (McGrew, 2004). محققین در سال 2002 برای اولین بار از لنتوویروس‌ها برای تولید تراریخت‌ها استفاده کردند (Lois et al., 2002, Pfeifer et al., 2002). مطالعات بر روی موش و موش صحرائی نشان دادند که تزریق حامل‌های لنتوویروسی VSV-Gpseudotyped داخل فضای پرده ویتلین اووسیت بارور شده، موش‌های تراریخت با راندمان بسیار بالا (68-73 درصد) تولید می‌کند (Lois et al., 2002). حامل-



شکل 4- تولید حامل های لنتی ویروسی. لنتی ویروس های نوع وحشی از سه ژن اصلی تشکیل شده اند (gag, pol & env) و توسط توالی های انتهایی تکرارشونده احاطه شده اند (رنگ مشکی). سیستم ویروس ها چند ژنی است که به موجب آن ساختمان و بسته بندی ژن ها به صورت بخش های جداگانه به داخل ژنوم میزبان ادغام می شود. ژن env می تواند با گلیکوپروتئین هترولوگوس که از ویروس های مختلف بدست آمده جایگزین شود که بیشتر از VSV-G استفاده می شود. سه پلازمید (یا بیشتر) به داخل لاین سلولی برای تولید حامل های ویروسی انتقال داده می شود (سلول های 293T). برای تولید حامل های ویروسی مایع فاز بالایی جمع آوری می شود و برای تولید تراریخت ها به وسیله آلوده سازی (A) یا تزریق مستقیم (B) با پروموتور ویروسی و یا سلولی در سلول های بارور شده یا نشده مورد استفاده قرار می گیرد (Park, 2007).

Figure 4 - Lentiviral vector production. The wild-type lentiviral genome is made up of 3 main genes (gag, pol & env) and it is surrounded by long-terminal repeats (black color). The vector system is a split-genome format whereby the packaging and structural genes have been separated and that promotes integration into the host genome. The env gene can be replaced with a heterologous glycoprotein from various viruses, including the prominently used VSV-G. The 3 plasmids (or more) are transfected into a cell line (293T cells) to produce the viral vectors, which are collected in the supernatant for in vitro transgenic applications either by infection (A) or by direct injection (B) can be used with viral or cellular promoter in fertilized or unfertilized cells (Park, 2007).

Prom: viral or cellular promoter, ZP: zona pellucida

مطالعات نشان می‌دهد که بازدهی انتقال و میزان بقا سلولی با استفاده از روش الکتروپوریشن در مقابل روش‌های لیپوزوم یا کلسیم فسفات اسید بالاتر است (به ترتیب 20/59 در مقابل 9/75 و 5/61 و 69/86 در مقابل 65 و 51/16 درصد) (Yu et al., 2010). محققان توانستند با تزریق 177 رویان گیرنده که سلول‌های بلاستودرم آن‌ها با الکتروپوریشن آمیخته شده بود، شش جوجه زنده تولید کنند (Aritomi & Fujihara, 2000). اما، در مطالعات اخیر روش انتقال لیپوزوم به طور گسترده-ای برای انتقال مؤثر ژن‌های خارجی درون سلول‌ها و جنین‌ها استفاده می‌شود (Suraeva et al., 2008; Wang et al., 2006). افزایش میزان لیپید در مخلوط لیپوزوم سبب افزایش به دام افتادن DNA در داخل لیپوزوم می‌شود، اما باعث کاهش انتقال DNA به اسپرم نیز می‌شود (Ono et al., 1994).

کاربردها

تکنیک‌های تراریخت کاربردهای گسترده-ای در پرندگان دارند لذا می‌توان به تولید پروتئین-های فعال زیستی با ارزش و تسریع در برنامه‌های پرورشی مرسوم به منظور افزایش و بهبود صفات تولیدی مطلوب اشاره کرد. باتوجه به موارد ذکر شده، مهمترین هدفی که در تحقیقات به آن توجه شده، بدست آوردن جوجه یا بلدرچین به عنوان راکتورهای زیستی، با هدف تولید پروتئین‌های

در کنار پیشرفت‌های فوق العاده استفاده از روش‌های ویروسی، معایب و مشکلات خاصی از قبیل مسائل ایمنی، احتمال ادغام رتروویروس‌ها در نزدیکی ژنهای سرطان‌زای²² بالقوه و به دنبال آن فعال شدن این ژن‌های سرطان‌زا و تبدیل شدن این سلول‌های با فعالیت طبیعی به سلول‌های سرطانی و غیره را به دنبال دارد (Cockrell & Kafri, 2007). لتوویروس‌ها توانایی انتقال قطعات DNA در حدود 8/5 تا 10 جفت کیلو باز را دارند. بنابراین برای استفاده از این حامل‌ها محققین مجبورند پروموتور را کوتاه‌تر در نظر گیرند و یا قسمت‌های از ژن را کوتاه کنند که این سبب تاثیر منفی در تظاهر ژن می‌شود (Mohammadabadi, 2008). مشکلات موجود در روش‌های ویروسی باعث شد پژوهشگران از راه‌های دیگری همچون ریزتزریقی، انتقال لیپوزوم، الکتروپوریشن و جداسازی کلسیم فسفات اسید استفاده کنند. ریزتزریقی تخم با انجام سه مرحله از سیستم کشت Ex Ovo باعث جوجه درآوری می‌شود (Love et al., 1994; Sherman et al., 1998). در سال 1994، ریزتزریقی DNA به درون پیش‌هسته تخم‌های جوجه تازه بارور شده گزارش شد، اما به دلیل بازدهی پایین انتقال و مراحل تولید پر زحمت، در تولید پرندگان تراریخت به میزان کمتری استفاده می‌شود (Love et al., 1994).

22 oncogene

شود، اثرات زیان آوری به بار خواهد آورد (Massoud et al., 1996). برای اولین بار در سال 2002 بیان پروتئین بتا لاکتاماز²³ انسانی در جوجه ها آغاز شد (Harvey et al., 2002a). محققان نشان دادند که می توان از جوجه ها به عنوان راکتورهای زیستی در تولید تجاری پروتئین های نو ترکیب استفاده مطلوب کرد. تاکنون پروتئین های نو ترکیب مختلفی مانند انواع مختلف آنتی بادی ها، آنزیم ها و سیتوکین ها با استفاده از جوجه و بلدرچین تراریخت در تخم تولید شده است. همچنین فاکتور پروتئین الحاقی نکروز کننده گیرنده FC تومورها با استفاده از حامل های ویروسی به شکل نو ترکیب در جوجه ها تولید شده است (Kyogoku et al., 2008). اخیراً پژوهشگران توانستند بیان آنتی بادی های منوکلونال را در جوجه ها با موفقیت اجرای کنند. سپس با ذبح جوجه های تراریخت با استفاده از آزمون وسترن بلات حضور آنتی بادی ها را در بافت های مختلف ردیابی کردند (Kamihiraa et al., 2009). به همین ترتیب، لاکتوفرین انسانی به شکل نو ترکیب در جوجه های تراریخت تولید شد. پروتئین تولید شده دارای فرم گلیکوزیله و مشخصات فیزیولوژیکی یکسانی با لاکتوفرین بدست آمده از شیر انسان بود. همچنین پژوهشگران نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین تولید شده در این سیستم با لاکتوفرین خالص شده از شیر انسان

نو ترکیب مفید و بازارپسند می باشد. زیرا سیستم راکتورهای زیستی پرندگان تراریخت در مقایسه با گیاهان، میکروارگانیسم ها و پستانداران دارای چندین مزیت بدین شرح می باشد: 1- تولید پروتئین در تخم پرندگان بیشتر است و همچنین بالغ بر 50 درصد این پروتئین ها، از بیان ژن های منفرد حاصل می شوند، بنابراین بدست آوردن مقدار زیادی پروتئین نو ترکیب همراه با خلوص بالا آسان می باشد (Robert, 2006). 2- الگوی گلیکوزیله شدن برخی از پروتئین های انسانی شباهت بیشتری به پروتئین های پرندگان در مقایسه با سایر سیستم های راکتورهای زیستی دارد (Raju et al., 2000). باید توجه داشت که اگر پروتئینی به شکل اختصاصی گلیکوزیله نشود سبب پاسخ ایمنی و یا باعث آشکار شدن پپتید می شود. در نتیجه این پروتئین ها به شکل آنتی ژن توسط لنفوسیت های B و T شناخته می شوند. 3- وجود مهارکننده های طبیعی پروتئین در محتویات تخم و همچنین محیط استریل طبیعی و کوچک سیستم تخم، یک محیط ایده آل برای ثبات فعالیت بیولوژیکی پروتئین های خارجی ایجاد می کند (Rapp et al., 2003). علاوه بر این مطالعات قبلی نشان داده اند، برخی پروتئین هایی که برای پستانداران سمی هستند، گاهی اوقات فقط می توانند در پرندگان تراریخت تولید شوند (Lillico et al., 2005; Zhu et al., 2007). برای مثال، اگر اریتروپویتین انسانی در سیستم پستانی خرگوش بیان

23 β -lactamase

برای افزایش و بهبود پروتئین بدون به خطر انداختن پرنده می‌باشد.

کاربردهای دیگر

ژنوم جوجه‌ها به شکل گسترده‌ای برای بررسی بیماری‌های خود ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rose, 1994). زیرا مارکرهای ژنتیکی، تفکیک پذیری بالایی از نقشه لینکاژی لوکوس‌های ناحیه خاصی از کروموزوم که ویژگی‌های فنوتیپی را کنترل می‌کنند، نشان می‌دهند. جوجه‌ها مدل‌های بسیار ایده‌آلی برای جراحی‌های کوچک چشم، توسعه رویان، تشکیل اندام، ساختار رگ‌های خونی و توسعه و عملکرد سلول‌های B می‌باشند (Kohonen et al., 2007; Leng et al., 2004). جوجه‌ها همچنین برای آدنوکارسینوم تخمدان²⁴، که یکی از بزرگترین دلایل سرطان در زنان می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Stammer et al., 2008). همچنین پژوهشگران نشان دادند که جوجه‌ها مدل‌های حیوانی بسیار مناسبی برای تحقیقات بر روی تصلب شرائین²⁵ هستند. زیرا سطح لیپوپروتئین موجود در آن‌ها بسیار مشابه انسان می‌باشد (Ayala et al., 2005). پیشرفت‌های اخیر در زیست فناوری سبب تولید جوجه‌های تراریخت به منظور مطالعه رشد آن‌ها، مقاومت در برابر بیماری‌ها و سرطان‌ها شده است. توانایی تولید

یکسان است (Tutykhina et al., 2009). پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری جوجه‌های تراریخت و نتایج اولیه بیان پروتئین‌ها در پرندگان دلگرم‌کننده می‌باشد (جدول 2). امید به توسعه پرندگان تراریخت برای تولید پروتئین‌های درمانی به شکل تجاری، در چند سال آینده به واقعیت تبدیل خواهد شد. شرکت‌های بزرگ زیست فناوری به شکل فعالانه به دنبال تحقق این هدف هستند. هنوز تعداد زیادی سوال بی‌جواب باقی مانده است که می‌بایست به آنها در سطح تولید پروتئین، تغییرات بعد از ترجمه و خالص سازی استاندارد جواب داد و سپس آن را به تصویب سازمان‌های نظارتی رساند.

با توجه به تحقیقات انجام شده قبلی، دو روش برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در تخم وجود دارد. انتقال ژن مورد نظر به سلول‌های اویداکت یکی از این روش‌هاست (Kawabe et al., 2008; Lillico et al., 2007). این روش شامل استفاده از پرموتورهای خاص بافت مثل پرموتور ovalbumin یا پرموتورهای ساختمانی می‌باشد. روش دیگر تولید پروتئین‌های هدف دارای ناحیه Fc یک آنتی‌بادی درون خون می‌باشد، که باعث تجمع پروتئین‌ها درون زرده از طریق انتقال LgY می‌شود (Kamihiraa et al., 2009; Kyogoku et al., 2008). اگر چه که در روش دوم پروتئین‌های هدف ممکن است به آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های ادغامی Fc محدود شده باشند، اما روش موثری

24 Ovarian Adenocarcinoma

25 Atherosclerosis

برابر ویروس آنفلونزا را افزایش دهند (Li et al., 2007). تولید پرندگان تراریخت به شکل صنعتی می‌تواند سبب بهبود ژنوتیپ های موجود، افزایش راندمان غذای مصرفی و کاهش چربی و کلسترول تخم شود (Mohammadabadi, 2007).

حیوانات تراریخت مقاوم به نوع خاص پاتوژن به دلیل کاهش هزینه‌های مرتبط با درمان و ضررهای ناشی از بیماری، دارای اهمیت بسیار بالایی می‌باشد. برای مثال، پس از تشخیص ژن Mx در جوجه‌ها پژوهشگران توانستند با وارد کردن و بدست آوردن بیان بالا از این ژن، سطح مقاومت در

جدول 2- بیان موفق پروتئین های نو ترکیب با استفاده از حامل های ویروسی.

Table 2 – Successful expression of the recombinant proteins using viral vectors.

منبع <i>Reference</i>	محل بیان <i>Expression Place</i>	حامل <i>Vector</i>	پروتئین <i>Protein</i>
Tutykhina et al., 2009	مایع آلانتوئیک <i>Allantoic Fluid</i>	آدنوویروس <i>Adenovirus</i>	لاکتوفیرین <i>Lactoferrin</i>
Kamihira et al., 2009	سفیده و زرده تخم <i>Egg white & Yolk</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	آنتی بادی منوکلونال <i>Monoclonal antibody</i>
Cherentaeva et al., 2008	کشت سلول <i>cell culture</i>	آدنوویروس <i>Adenovirus</i>	بتا اینترفرون <i>β-interferon</i>
Kyogoku et al., 2008	زرده تخم و سرم <i>Egg white & Yolk</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	فاکتور نکروز کننده تومور <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Kodama et al., 2008	سفیده تخم <i>Egg white</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	اریتروپویتین <i>Erythropoietin</i>
Masamichi et al., 2005	سرم و سفیده تخم <i>Serum & Egg white</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	پروتئین الحاقی تک زنجیره ای Fv-Fc <i>Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein</i>
Mozdziak et al., 2003	سفیده تخم <i>Egg white</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	بتا گالکتوزیداز <i>β-galactosidase</i>
Harvey et al., 2002b	سفیده تخم <i>Egg white</i>	رتروویروس <i>Retroviral</i>	بتا لاکتاماز <i>β-lactamase</i>

نتیجه گیری

شود. اما تاکنون گزارشی مبنی بر تولید سلولهای زایای شیمیر با استفاده از سلولهای شبه ESC وجود ندارد. علاوه بر این مشکلات، ممکن است نگرانیهای روز افزون امنیت محصولات بدست آمده از پرندگان تراریخت، کاربرد عملی برخی از فناوریهای کارآمد و مفید را برای استفاده از ویروسها در آینده محدود کند. با توجه به سلولهای هدف مختلف و روشهای انتقال ژن در دسترس، ما معتقدیم هدف قرار دادن SSCs در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از انتقال ژن بر اساس غیر ویروسی و تزریق مجدد آنها درون بیضه خروس مؤثر و کم هزینه ترین روش برای تولید پرندگان تراریخت می باشد. اما نمی توان از PGCSها و سلولهای بنیادی پرتوان به پاس ویژگیهای منحصر به فردشان در بهبود و افزایش راندمان تراریختها چشم پوشی نمود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقایان پروفسور لی و هان به پاس زحمات و مشاوره های خردمندانه، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. همچنین از همکاران محترم جناب آقایان دکتر مجتبی طهمورث پور، دکتر احمد رضا بهرامی و دکتر حسام دهقانی که در بحث های علمی مقاله مروری همکاری شایسته ای داشتند صمیمانه سپاسگزاریم.

ویژگیهای بسیار مناسب جوجهها سبب شده که طی یک دهه اخیر از آنها برای ایجاد تراریختها و زیست شناسی تکاملی استفاده شود. فناوریهای مورد نیاز برای تولید پرندگان تراریخت و روشهای دستکاری تراریختها و بیان ژن در طی دهه گذشته توانسته پیشرفت های بزرگی را در صنعت پرندگان ایجاد کند. بررسیها انجام شده در این مقاله نشان داد که جوجهها مدل حیوانی مناسبی برای بررسی بسیاری از بیماریهای انسانی هستند، اما جوجههای تراریخت می توانند به عنوان مدل مناسب تری برای پژوهش های خاص دارویی و زیست فناوری مورد استفاده قرار گیرند. هنوز مشکلات عمده ای باقی مانده، که باید قبل از تولید پرندگان تراریخت به آنها توجه ویژه و راهکارهای مناسبی برای آنها پیشنهاد نمود. تحقیقات انجام شده بر روی تراریختها همگی بر روی انتخاب حامل مناسب برای انتقال موفق ژن مورد نظر تاکید دارند، زیرا سیستم پرندگان از نظر سلولی با پستانداران تفاوت کمی دارند. اما تقریباً تمامی محققین بر این عقیده هستند که جوجههای تراریخت ابزاری قدرتمند و مفید برای تحقیقات در حوزه زیست فناوری محسوب می شوند. به طور کلی تصور بر این است که BDCs کشت داده شده برای مدت طولانی، می تواند به سلولهای شبه ESC تبدیل

- Allioli N, Thomas J, Chebloune Y, Nigon V, Verdier G, Legras C (1994). Use of retroviral vectors to introduce and express the b-galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Developmental Biology* 165:30-37.
- Aritomi S, Fujihara N (2000). Production of chicken chimeras by fusing blastodermal cells with electroporation. *Asian Journal of Andrology* 2:271-275.
- Ayala I, Pérez BG, Doménech G, Castells MT, Valdés M (2005). Use of the Chicken as an Experimental Animal Model in Atherosclerosis. *Avian and Poultry Biology Reviews* 16:151-159.
- Bednarczyk M, Lakota P, Siwek M (2000). Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastodermal cells. *Poultry Science* 79:1823–1828.
- Borwornpinyo S, Brake J, Mozdziak PE, Petite JN (2005). Culture of Chicken Embryos in Surrogate Eggshells. *Poultry Science* 84:1477–1482.
- Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, Kozar L, Martin F, Green C, Jacobsen F, Nicholson M, Schultz JA, Semon KM, Rishell W, Stewart G, Scangos A (1989a). Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243:533–535.
- Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, Souza L, Kozar L, Martin F, Nicholson M, Rishell W, Schultz J, Simon K, Stewart RG (1989b). Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo. *Journal of Virology* 63:2680–2689.
- Brinster RL, Avarbock MR (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:11303–11307.
- Brinster RL, Zimmermann JW (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:11298–11302.
- Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ (1993). Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669–750.
- Chapman SC, Lawson A, MacArthur WC, Wiese RJ, Loechel RH, Burgos-Trinidad M, Wakefield JK, Ramabhadran R, Mauch TJ, Schoenwolf GC (2005). Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development* 132:935-940.
- Cherentaeva EA, Logunov DIU, Verkhovskaya LV, Mezentseva MV, Shmarov MM, Ershov FI, Naroditskii BS, Gintsburg AL (2008). Production of the human β -interferon recombinant protein in avian cell culture *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologia, I Virusologia* 23:153-157.

- Cockrell AS, Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology* 36:18-204.
- Dodgson JB (2007). The chicken genome: some good news and some bad news. *Poultry Science* 86:1453-1459.
- Dunn DA, Kooyman DL, Pinkert CA (2005). Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discoveries & Therapeutics* 10:757-767.
- Eyal-Giladi H, Kochav S (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: General morphology. *Developmental Biology* 49:321-337.
- Furuta H, Fujihara N (1999). Proliferation of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan treated chicken embryos. *Asian journal of andrology* 1:187-190.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77:7380-7384.
- Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL (2005). Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:17430-17435.
- Han JY (2009). Germ cells and transgenesis in chickens. *Microbiology and Infectious Diseases* 32:61-80.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie RI (2002a). Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high throughput screening procedures. *Poultry Science* 81:202-212.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie RI (2002b). Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnology* 20:396-399.
- Jung JG, Lee YM, Park TS, Park SH, Lim JM, Han JY (2007). Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. *Biology of Reproduction* 76:173-182.
- Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T, Naito M (1997). The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donorderived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Molecular Reproduction and Development* 48:501-510.
- Kamihiraa M, Kawabea Y, Shindob T, Onoc K, Esakac K, Yamashitab T, Nishijimac K, Iijima S (2009). Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *Journal of Biotechnology* 141:18-25.
- Kamihiraa M, Ono K, Esaka K, Nishijima R, Kigaku R, Komatsu H (2005). High-level expression of singlechain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically modified chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology* 79:10864-10870.

- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Mili H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003). Long-term proliferation in culture and gremlin transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction* 69:612-616.
- Kawabe YNT, Komatsu H, Nishijima K, Iijima S, Kamihira M (2008). Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106:598-601.
- Kodama D, Nishimiya D, Iwata K, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motono M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K, Kamihira M, Iijim AS (2008). Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochemical and Biophysical Research* 367:834-839.
- Kohonen P, Nera KP, Lassila O (2007). Avian Model for B-Cell Immunology – New Genomes and Phylotranscriptomics. *Scandinavian Journal of Immunology* 66:113–121.
- Kulesa PM, Bailey CM, Cooper C, Fraser SE (2010). In Ovo Live Imaging of Avian Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols* 6:5446.
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T (2004). Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research* 320:442–448.
- Kyogoku k, Yoshida K, Watanabe H, Yamashita T, Kawabe Y, Motono M, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S (2008). Production of Recombinant Tumor Necrosis Factor Receptor/Fc Fusion Protein by Genetically Manipulated Chickens. *Bioscience And Bioengine Ering* 105:454–459.
- Lee YM, Jung JG, Kim JN, Park TS, Kim TM Shin SS (2006). A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biology of Reproduction* 75:380–386.
- Leng TH, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, huie P, Blumenkranz MS (2004). The chich chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Journal of Retinal and Vitreous Diseases* 24:427–434.
- Li BC, Sun GB, Sun HC, Xu Q, Gao B, Zhou GY, Zhao WM, Wu XS, Bao WB, Yu F, Wang KH, Chen GH (2008). Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells in vivo andm ex vivo transfection. *Science in China Press* 51:734-742.
- Li XY, Qu LJ, Hou ZC, Yao JF, Xu GY, Yang N (2007). Genomic structure and diversity of the chicken Mx gene. *Poultry Science* 86:786–789.
- Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard C, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104:1771-1776.
- LillicoSG, McGrew JM, Sherman A, Sang HM (2005). Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discoveries & Therapeutics* 10:191-196.

- Lim JM, Kwon HM, Kim DK, Kim JN, Park TS, Ono K (2006). Selective decrease of chicken embryonic primordial germ cells in vivo and in vitro by soft X-ray Irradiation. *Anim. Animal Reproduction Science*. 95:67-74.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore DB (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295:868–872.
- Love J, Gribbin C, Mather C, Sang H (1994). Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12:60-63.
- Maeda T, Yamakawa Y, Masuda K, Terada T (1997). Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs. *British Poultry Science* 38:38: 241-242.
- Masamichi K, Ken-ichiro O, Kazuhisa E, Ken-ichi N, Hiroyuki K, Takashi Y, Kenji K, Shinji I (2005). High-Level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology* 79:10864-10874.
- Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM (1996). The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction Nutrition Development* 35:555-563.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Reports* 5:728–733.
- Mizuarai S, Ono K, Yamaguchi K, Nishijima K, Kamihira M, Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H (2001). Production of transgenic quails with high frequency of germ-Line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector *Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications* 286:456-463.
- Mohammadabadi MR (2007). Biotechnology and future of transgenic animals. *Proceeding of the Environment and stable development of agriculture congress*. Research centre of Jahad-e-Keshavarzi of Kerman, Kerman, Iran 142-158. (In Persian)
- Mohammadabadi MR (2008). Reception methods of transgenic poultry. *Proceeding of 2nd National Congress of Cellular and Molecular Biology*, Kerman, Iran 317-321. (In Persian)
- Motono M, Yuki Y, Yuki H, Ryo N, Nishijima K, Shinji I (2010). Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109:315-321.
- Mozdziak PE, Borwornpinyo S, McCoy DW, Petite JN (2003). Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Developmental Dynamics* 226:439–445.
- Mozdziak PE, Wysocki R, Stewart JA, Pardue SL, Petite JN (2006). Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cellsorted gonocytes. *Poultry Science* 85:1764-1768.

- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T (2007). Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science* 86:2182-2193.
- Ono T, Muto SI, Mizutani M, Agata K, Mochii M, Kino K, Otuska K, Ohata M, Yoshida M, Eguchi G (1994). Production of quail chimera by transfer of early blastodermal cells and its use for transgenesis. *Poultry Science* 31:119-129.
- Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches R (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.
- Park F (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis. *Physiological Genomics* 31:159–173.
- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM (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 MM (1988). A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331:70–72.
- Petitte JN, Clark ME, Liu G, Gibbins AMV, Etches R (1990). The production of somatic and germline chimeras in the chick by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108:185–190.
- Petitte JN, Liu G, Yang Z (2004). Avian pluripotent stem cells. *Mechanisms of Development* 121:1159–1168.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:2140–2145.
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones A (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10:477-486.
- Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R (2003). Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Research* 12:569-575.
- Robert I (2006). Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends in Biotechnology* 24:99-101.
- Rose NR (1994). Avian models of autoimmune disease: lessons from the birds. *Poultry Science* 73:984-990.
- Rowlett KA, Simkiss K (1987). Explanted embryo culture: in vitro and in vivo techniques for domestic fowl. *Poultry Science* . 28:91–101.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Fadly AM, Witter RL, Crittenden LB (1986). Gene insertion into the chicken germline by retroviruses. *Poultry Science* 65:1445–1458.

- Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H (1998). Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line. *Nature Biotechnology* 16:1050–1053.
- Speksnijder G, Ivarie R (2000). A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilized chicken eggs. *Poultry Science* 79:1430-1433.
- Stammer K, Edassery SL, Barua A, Bitterman P, Bahr JM, Hales DB, Luborsky JL (2008). Selenium-Binding Protein 1 expression in ovaries and ovarian tumors in the laying hen, a spontaneous model of human ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 109:115–121.
- Suraeva NM, Byryshnikov AY, Fisinin VI, Prokofiev MI (2008). A study of the efficiency of different methods to transfer a reporter gene to chicken embryonic cells. *Biology Bulletin* 35:12-16.
- Tutykhina IL, Bezborodova OA, Shmarov MM, Logunov DY, Neugodova GL, Nemtsova ER, Naroditsky BS, Yakubovskaya RI, Gintsburg AL (2009). Production of recombinant human lactoferrin in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs and its characteristics. *Protein Expression and Purification* 65:100–107.
- Van de Lavoie MC, Christine ML, Philip L, Jennifer HD, Babette SH, Rhys R, Lei Z, Peggy WD, Allyn K, Terri G, Susan S, Mary ED, Robert JE (2006). High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. *Mechanisms of Development* 123:31-41.
- Vick L, Li Y, Simkiss K (1993). Transgenic birds from transformed primordial germ cells *Proceedings. Biological sciences* 251:179–182.
- Wang YL, Brooks CF, Jones SA, Olliff LK, Morgan M, Speksnijder GL, Foley C, Harvey AJ (2006). Progress Toward the Culture and Transformation of Chicken Blastodermal Cells. *Stem Cells* 24:1638-1645.
- Yu F, Ding LJ, Sun GB, Sun PX, He XH, Ni LG, Li BC (2010). Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Molecular Reproduction and Development* 77:340-347.
- Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Pina MC, Severino C, David FD, Shrikant D, Jennifer HD, Lynae G, Edward LH, Babette SH, Robert MK, Allyn K, Philip AL, Christine MM, Sherie LM, Zivko LN, David BP, Alicia PM, Benjamin TP, Vangipuram SR, Mingxia S, Mohan S, Steven GW, Peggy WD, Susan W, Wen Z, Robert JE (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology* 23:1159-1169.

The generating methods of transgenic chickens and its potential application in biotechnology

Nassiry M.R.¹, Ghovvati S.^{2*}, Mohammadabadi M.R.³, Ariannezhad H.², Doosti M.²

¹ Associate Professor, Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Ph. D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, P. O. Box: 91775-1163, Iran

³ Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

During the last decades, potential of genetic modifications at the molecular level has created great revolution in biology. Transgenic technology has provided the possibility of connection between different techniques in field of embryology, cellular biology and molecular genetics. Nowadays, transgenic chicken are used as efficient research tools in many institutions. So, many researchers believe that before any research in the field of genetic manipulation, these methods should be optimized. Regarding to the remarkable progress of biotechnology, direct manipulation of chicken embryo by DNA or viral vectors is possible but generally, using this methods can not create a specific site and target genes for genetic manipulation. To fix this problem, recently, many scientists have proposed and improved different methods to generate transgenic chickens based on Blastodermal cells (BDCs), Embryonic stem cells (ESCs), Primordial germ cells (PGCs) and Spermatogonial stem cells (SSCs). By the way, recently the complicated system for the isolation, expansion, transfection, selection and re-expansion embryonic stem cell cultures and the subsequent production of high-grade somatic chimeras was improved and their results were published in scientific papers. In recent years, the results of several studies have shown testicular culture method from spermatogonial somatic cells (SSCs) is the newest, easiest and most efficient method of transgenic chicken generation. This method has been used biological process of sperm production and SSCs as inducer in transgenic chicken. Although, use of the viral systems can be lead to gene transfer with high efficiency, but the safety issues limited its practical applications. Nowadays, the methods of chimeras germ cells production and pluripotent stem cells manipulation are combined and used to generate transgenic birds. This review has attempted to describe the most important methods of generating transgenic chickens, the methods of gene transfer and also the application of transgenic chickens as bioreactor in biology.

Keywords: *Transgenic chickens, Gene transfer, Genetic manipulation, Pluripotent cells, Viral vectors and Stem cells.*

* Corresponding Author: Ghovvati S.

Tel: 05118795618

Email: Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir