نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 4، زمستان 1395، ص. 666-656

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 4, Winter 2017, p. 656-666

استفاده از لیپوفکتامین به منظور ترانسفکشن اسپرم گاو نژاد هلشتاین

اکرم تیمورنژاد[1]- محمد زندی[2*]- محمدرضا سنجابی[2]- خسرو حسینی پژوه[3] - حمیده افقی[4]

تاریخ دریافت: 1395/02/13
تاریخ پذیرش: 1395/05/26

چکیده

اساس انتقال ژن از طریق اسپرم بر مبنای توانایی سلول‌های اسپرم برای اتصال به ملکول DNA خارجی و انتقال آن به اووسیت در موقع لقاح است. از مزایای عمده این روش نسبت به سایر روش‌ها می‌توان به بهره‌وری بالا، هزینه کم و سهولت استفاده اشاره کرد. هدف از این مطالعه بررسی امکان انتقال ژن به اسپرم گاو بود. برای این منظور، اسپرم از ناحیه اپیدیدم بیضه گاوهای نژاد هلشتاین استحصال شد. با استفاده از روش لیپوفکشن، حامل حاوی ژن GFP به سلول‌های اسپرم انتقال داده شد. به منظور بررسی انتقال DNA به اسپرم و همچنین زنده مانی اسپرم‌های ترانسفکت به ترتیب از رودامین و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد. نتایج نشان داد، در حدود 19 درصد از اسپرم‌های حاصل از ناحیه اپیدیدیم بیضه قادر به جذب DNA خارجی بودند و افزایش مدت زمان انکوباسیون کمپلکس DNA- لیپوفکتامین با اسپرم از 30 تا 120 دقیقه اثر معنی‌داری بر روی جذب DNA خارجی نداشت. همچنین نتایج نشان داد، انتقال ژن به اسپرم گاو تأثیر معنی‌داری بر روی زنده مانی و تعداد اسپرم‌های پیش‌رونده در مقایسه با اسپرم‌های طبیعی، 120 دقیقه پس از ترانسفکشن نداشت، اگرچه در 30 الی 60 دقیقه اول از ترانسفکشن اختلاف معنی‌داری در تحرک اسپرم‌های ترانسفکت مشاهده شد. به منظور بهینه‌سازی جذب DNA توسط اسپرم پیشنهاد می‌شود علاوه بر استفاده از ترکیباتی مانند EDTA به منظور حذف DNase، استفاده از سایر حامل‌ها مانند توربوفکت و FuGene 6 نیز بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انتقال ژن به واسطه اسپرم، ترانسفکشن، گاو، لیپوفکتامین.

مقدمه

به جاندارانی که از نظر ژنتیکی دستکاری شده‌اند تراریخت گفته می شود. در فناوری تولید جانداران تراریخت، یک یا چند ژن به ژنوم طبیعی جاندار اضافه می‌شود (19). تولید حیوانات تراریخته از جنبه‌های افزایش سرعت رشد حیوانات و بازده بیشتر تولید محصول، مقاومت بیشتر حیوانات در برابر بیماری‌ها، تولید ترکیبات دارویی در شیر، تولید حیواناتی که قادر به تامین هموگلوبین انسانی و یا قادر به تأمین اندام‌ها برای انسان باشند، تولید شیر شبیه شیر انسان و تغییر ترکیبات شیر (لاکتوز، لیزوزیم و ...) اهمیت فراوانی دارد (18).

روش‌های انتقال ژن شامل ریزتزریق به داخل پیش هسته، انتقال هسته سلول‌های بدنی و انتقال ژن از طریق ویروس‌ها، سلول‌های پایه رویانی، اسپرم و تخمک می‌باشند (6). هر چند ریز تزریق به داخل پیش هسته اولین روشی بود که توسط آن موش‌های تراریخته تولید شد و از آن به بعد برای ایجاد سایر گونه‌های تراریخته مانند خرگوش، گوسفند، خوک و گاو مورد استفاده قرار گرفت (34)، اما این روش که همان ریز تزریقی نام دارد به طور کلی برای حیوانات مزرعه‌ای کارآمد نمی‌باشد و دارای محدودیت است (33). به طوری که در صورت استفاده از این روش برای گاو، به دلیل دارا بودن چربی زیاد و اووسیت کدر، لازم است برای مشاهده پرونوکلئوس‌ها از روش‌های رنگ‌پذیری و میکروسکوپ‌های دارای فازکنتراست استفاده شود. همچنین روش ریز تزریق به داخل پیش هسته دارای معایبی همچون بازدهی بسیار کم، وارد شدن تصادفی ترانس ژن به داخل ژنوم میزبان و نرخ موزاییک زیاد می‌باشد (5). استفاده از لنتی ویروس‌ها برای انتقال ژن به درون تخمک یا سلول تخم دارای بازدهی بالا است که مهمترین محدودیت این روش عدم توانایی حمل ترانس ژن‌هایی با طول بیش از 8/5 کیلوباز می‌باشد (29). روش

1- پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،
2- استادیار گروه علوم دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،
3- استادیار گروه زیست انرژی و فرآیندهای تبدیلی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،
4- دانشیار گروه زیست فناوری پزشکی و صنایع داروئی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: mz1075@yahoo.com
DOI: 10.22067/ijasr.v1i1.55609

دیگر، انتقال ژن با استفاده از سلول‌های پایه رویانی است (27). در روش سلول‌های پایه رویانی، سلول‌های پایه رویانی را در شرایط برون‌تنی تکثیر کرده و ژن مورد نظر را به ساختار DNA آنها انتقال می‌دهند. سپس سلول‌های پایه رویانی را به درون حفره بلاستوسیست رویان تزریق می‌کنند. بعد از مدتی سلول‌های پایه رویانی بخشی از توده سلولی درونی رویان می‌شوند. با انتقال رویان‌های ترانس ژن به رحم حیوانات گیرنده می‌توان منتظر متولد شدن حیوانات تراریخته بود. این حیوانات نیز از نوع کایمریک هستند (12). روش انتقال ژن با استفاده از انتقال هسته روش دیگری است که برای انتقال ژن‌های جدید و تولید حیوانات تراریخته استفاده می‌شود (15). این روش معتبرترین تکنیکی است که در انتقال ژن استفاده می‌شود و حیوان تراریخته ایجاد شده در این روش فاقد سلول‌های موزاییک بوده است. با این وجود مراحل انجام کار پیچیده و نیاز به بهینه‌سازی بیشتری دارد (21). روش بسیار ساده دیگر، استفاده از اسپرم به عنوان حامل ترانس ژن به تخمک است. انتقال ژن با استفاده از اسپرم در سال 1989 برای موش موفقیت آمیز بود. این روش یک فن‌آوری بر اساس توانایی جذب DNA خارجی توسط سلول های اسپرم و انتقال آن به درون تخمک در موقع لقاح است(15). از آنجا که DNA دارای بار الکتریکی منفی است می‌تواند با پروتئین‌های بخش پشتی آکروزوم و کناره‌های سر اسپرم که دارای بار الکتریکی مثبت هستند پیوند یابد (22). در این روش DNA با منشأ خارجی به درون DNA اسپرم وارد می‌شود، به طوری که نه تنها DNA اسپرم بلکه DNA خارجی هم به داخل سلول مورد نظر وارد می‌شود (36).

مشخص شده است که از این روش می‌توان برای تولید اسپرم‌های تراریخته حیوانات مختلف استفاده کرد (23). همچنین انتقال ژن به واسطه اسپرم می‌تواند انتقال ژن را در مقیاس انبوه فراهم کند (36). اگرچه حیواناتی با روش انتقال ژن به واسطه اسپرم تولید شده‌اند، ولی بازده این روش هنوز هم کم است که عمدتا دلیل آن جذب کم اسپرم‌های با DNA خارجی می‌باشد. در نتیجه کاهش باروری و لقاح تخمک با اسپرم ترانس ژن شده را به همراه دارد (18). علاوه بر این درصد موفقیت در این روش بین و درون گونه‌ها متفاوت است (8).

در تولید حیوانات تراریخته توسط روش انتقال ژن به واسطه اسپرم، بسیار مهم است که DNA خارجی با سر اسپرم ترکیب شود و این نیز اهمیت دارد که اسپرم ترانسفکت شده قدرت عملکرد و باروری خود را به داخل تخمک حفظ کند (8). غشای پلاسمایی اسپرم نیز نقش مهمی در تعامل پیوند با DNA ایفا می‌کند (10). بنابراین تغییر غشا و فرآیندهای غشایی روی پیوند DNA و کروماتین اسپرم به طور مستقیم تأثیر می‌گذارد و در نتیجه، سبب افزایش احتمال ادغام آنها می‌شود. به منظور بهبود اتصال DNA و اسپرم روش‌های گوناگونی مانند استفاده از کمپلکس DNA و لیپوزوم (6)، الکتروپوریشین (34)، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونو کلونال برای برقراری پیوند DNA خارجی به اسپرم (5) و استفاده از دی متیل سولفوکسید، که به انتقال DNA خارجی به اسپرماتوزوآ کمک می‌کند (29).

هدف از این مطالعه انتقال DNA خارجی به اسپرم‌های گاو نژاد هلشتاین با استفاده از حامل لیپوفکتامین و بررسی زنده مانی و تحرک اسپرم‌های ترانسفکت بود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

به منظور انجام آزمایش محیط‌های کشت از شرکت اینوکلون (ایران) و سایر مواد شیمیایی که در متن به آنها اشاره نشده است از شرکت سیگما (امریکا) تهیه شدند.

آماده سازی سازه ژنی(حامل GFP)

به منظور آماده سازی سازه ژنی 2-1 میلی‌لیتر باکتری *ای‌کولای* (سویه تاپتن)[1] حاوی پلاسمید pEGFP–N1 (شکل 1)، در 15 میلی‌لیتر محیط کشت LB براث به مدت یک شبانه روز کشت داده شد و باکتری *ای‌کولای* به 50 میلی‌لیتر از محیط کشت LB براث حاوی کانامایسین (30 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد و در شیکر با دمای 37°C و دور RPM 150 به مدت یک شب قرار داده شد، پس از رسیدن به جذب نوری مناسب (بیشتر از 1/7) استخراج DNA پلاسمید بر اساس روش شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت.

خطی کردن حامل حاوی GFP توسط آنزیم *StuI*

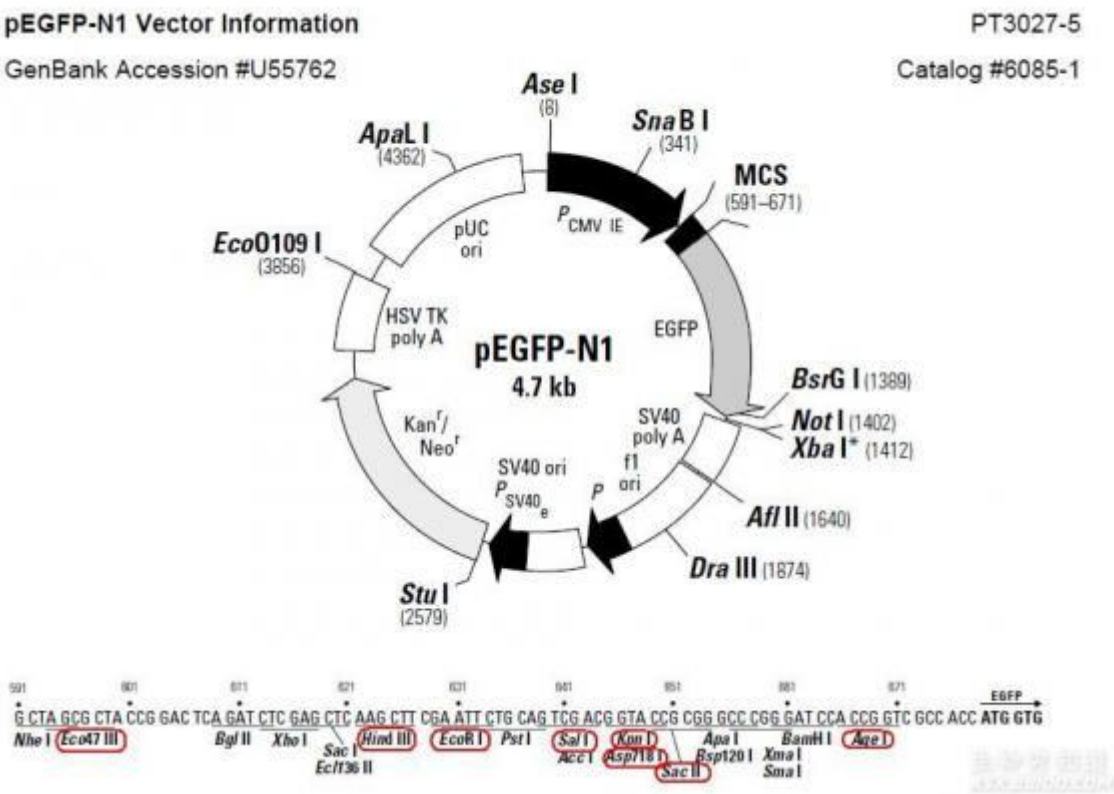
بعد از تهیه سازه ژنی، حامل مورد نظر توسط آنزیم برش دهنده *StuI* خطی گردید. برای این منظور از روش شرکت Takara BIO INC استفاده شد. به طور خلاصه یک میکرولیتر آنزیم *StuI*، دو میکرولیتر از بافر X 10 و یک میکروگرم DNA توسط آب مقطر به حجم 20 میکرولیتر رسانده شد و چهار ساعت در دمای 37°C قرار گرفت. سپس به مدت 30 دقیقه در دمای 70°C نگهداری شد تا آنزیم غیرفعال گردد. برای تأیید خطی کردن حامل حاوی GFP بر روی ژل آگارز 1درصد الکتروفورز افقی صورت گرفت.

خالص‌سازی پلاسمید

به منظور خالص‌سازی پلاسمید از کیت E.Z.N.A.® Plasmid Midi Kit (شرکت Omega bio-tek، آمریکا) استفاده شد. به طوری که در این آزمایش حجم نمونه 570 میکرولیتر بود که هم حجم آن

1- *E.coli* (Top 10 strain)

یعنی 570 میکرولیتر بافر اتصال اضافه شد و به مدت 5 دقیقه در دمای 50°C انکوبه شد.



شکل 1- حامل پلاسمید pEGFP– N1 (Clontech Laboratories, Inc.)

Figure 1- pEGFP-N1 plasmid vector (Clontech Laboratories, Inc.)

800 میکرولیتر از کل نمونه و بافر روی ستون ریخته شد و به مدت 1 دقیقه با دور 12000 RPM سانتریفیوژ شد و مایع رویی بیرون ریخته شد. سپس 700 میکرولیتر از بافر شستشو را روی ستون ریخته و دوباره به مدت 1 دقیقه با دور 12000 RPM سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد و برای بار سوم به منظور خارج کردن الکل محلول شستشو با دور 12000 RPM به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت به میزان 50 میکرولیتر بر روی ستون آب ریخته شد و دوبار با دور پایین سانتریفیوژ شد، به طوری که برای بار دوم 50 میکرولیتر اول را از قسمت زیر ستون جمع کرده و روی ستون ریخته شد. مایع جمع شده در تیوپ حاوی پلاسمید خالص شده بود.

نشاندار کردن پلاسمید با رودامین

به منظور نشاندار کردن پلاسمید از روش شرکت Thermo Scientific (آمریکا) استفاده شد. به طوری که از هرکدام از dNTPs به مقدار 1 میکرولیتر به میکروتیوپ‌های حاوی 9 میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس 2 میکرولیتر از هرکدام از dATP، dGTP، dCTP و 1/3 میکرولیتر از dTTP را با هم مخلوط کرده و 7/5 میکرولیتر از ethylTetram-rhodamine-5-dUTP به آن اضافه شد و حجم نهایی به 20 میکرولیتر رسانده شد. میزان 7/3 میکرولیتر از dNTP را با 7/5 میکرولیتر از dUTP مخلوط شد. به طوری که حجم آن 14/8 میکرولیتر بود، سپس حجم به 20 میکرولیتر رسانده شد که برای این منظور 5/2 میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد، به طوری که در نهایت 3 میکروگرم DNA خطی، مقدار 1/25 میکرولیتر dNTP، 0/75 میکرولیتر dUTP، 2 میکرولیتر هگزانوکلئوتید، 1 میکرولیترآنزیم کلنو، 2 میکرولیتر بافر آنزیم کلنو را با هم مخلوط شده و حجم نهایی به 20 میکرولیتر رسانده شد. به صورت جداگانه پلاسمید برش خورده و خالص شده به مدت 10 دقیقه در انکوباتور C ° 90 قرار گرفت و سریعا روی یخ انتقال داده شده و مخلوط DNA و dNTP که در مرحله قبل تهیه شده بود، به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ کوتاه و مخلوط شدن تمام ترکیبات به مدت یک شب در در دمای °C 37 قرار گرفت. به منظور غیر فعال کردن آنزیم به مدت

15 دقیقه در دمای 52 ^{o}C انکوبه گردید.

آماده سازی بیضه و استحصال اسپرم گاو

بیضه‌های گاو از کشتارگاه صنعتی میثم واقع در رباط کریم تهران جمع‌آوری شده و در فاصله زمانی دو الی چهار ساعت در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی بیضه ها با آب مقطر و ضد عفونی با الکل 70% و شستشو مجدد با آب مقطر حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (50 µg/ml)، با استفاده از تیغ جراحی، اپیدیدیم از جایی که رگ خونی نباشد برش زده شد و 200 میکرولیتر از نمونه اسپرم در 1 میلی لیتر محیط کشت DPBS جمع‌آوری شد.

ترانسفکشن نمونه اسپرم

به منظور ترانسفکشن سلول‌های اسپرم 2 میکروگرم از کمپلکس DNA نشاندارشده با رودامین و 0/5 میکرولیتر از لیپوفکتامین در 25 میکرولیتر محیط کشت DMEM بصورت جداگانه به مدت 5 دقیقه انکوبه شدند، پس از آن DNA و توربوفکت با همدیگر ترکیب شده و به مدت 20 دقیقه در دمای 37^{o}C انکوبه شدند. سپس 1×10^{6} اسپرم با کمپلکس DNA و لیپوفکتامین بر اساس طرح آزمایشات در دمای 37^{o}C انکوبه شدند. تعداد اسپرم‌ها به روش هموسیتومتر با استفاده از میکروسکوپ نوری، روی لام نئوبار شمارش شدند. جهت بررسی اسپرم‌های ترانس ژن از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر رنگ آبی استفاده شد.

رنگ آمیزی نمونه اسپرم

روش اکریدین ارنج یک رنگ آمیزی فلورسنت است که برای تمایز DNA سالم دورشته ای از DNA دناتوره شده و تک رشته‌ای به کار می‌رود و به عنوان تست مقاومت اسپرم در مقابل دناتوره شدن مطرح است. به طوری که زیر میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر سبز، اسپرم‌های مرده را به رنگ قرمز و زنده را به رنگ سبز نشان می‌دهد. برای این منظور 2/4 میلی‌گرم از پودر اکریدین ارنج با 18 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس نمونه‌های اسپرم با استفاده از رنگ اکریدین ارنج رنگ آمیزی شده و به مدت 5 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. جهت بررسی از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر رنگ سبز استفاده شد.

طرح آزمایشات

آزمایش اول: بررسی زمان انکوباسیون کمپلکس DNA-لیپوفکتامین با اسپرم:

برای این منظور 50 میکرولیتر محیط DMEM حاوی 1×10^{6} اسپرم و کمپلکس DNA و لیپوفکتامین در زمان‌های انکوباسیون 30، 60 و 120 دقیقه مورد بررسی قرار گرفت و تعداد 100 اسپرم در سه تکرار شمارش شدند.

آزمایش دوم: بررسی زنده مانی و تحرک اسپرم‌های ترانس ژن در فاصله زمانی 30، 60 و 120 دقیقه

زنده مانی اسپرم‌های ترانس ژن در زمان‌های انکوباسیون 30، 60 و 120 دقیقه با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین ارنج و تحرک اسپرم‌های ترانسفکت در سه گروه دارای حرکت پیش رونده، حرکت غیر پیش رونده و فاقد تحرک در زمان های انکوباسیون 30، 60 و 120 دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری

برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در مجموع در هر تکرار تعداد 100 اسپرم شمارش شد. نتایج به صورت Mean ± SEM[1] نمایش داده شدند. آنالیزهای آماری برای مقایسه دو تیمار توسط t-test و بیش از دو تیمار با استفاده از رویه ANOVA از نرم افزار آماری SPSS 16 صورت گرفت. مقایسه بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و معنی‌داری در سطح $P< 0.05$ گزارش شد.

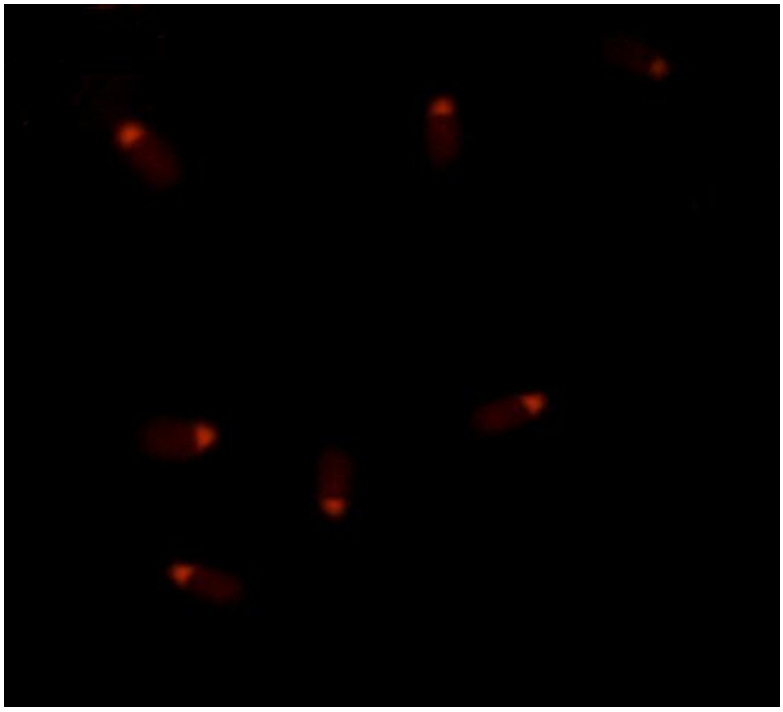
نتایج و بحث

آزمایش اول: بررسی زمان انکوباسیون کمپلکس DNA-لیپوفکتامین با اسپرم

در این مطالعه با توجه به نتایج حسینی پژوه و همکاران (17) از زمان های 30، 60 و 120 دقیقه به منظور انکوباسیون کمپلکس DNA- لیپوفکتامین با اسپرم استفاده شد. نتایج حاصل از ترانسفکشن اسپرم‌های حاصل از ناحیه اپیدیدیم با استفاده از لیپوفکتامین نشان داد که اسپرم‌ها قادر به جذب DNA خارجی می‌باشند (شکل 2) اما افزایش مدت زمان انکوباسیون کمپلکس DNA- لیپوفکتامین با اسپرم، اثر معنی‌داری بر روی جذب DNA خارجی نداشت. میانگین جذب DNA خارجی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در حدود 19 درصد بود.

اتصال DNA خارجی به اسپرم نه تنها در گونه‌های مختلف بلکه در بین نژادهای داخل گونه‌ها نیز متفاوت و بین 5 تا 88% گزارش شده است. بازدهی انتقال ژن از روش انتقال ژن از طریق اسپرم، از 12/5 درصد در گاو تا 88 درصد در خوک گزارش شده است (11، 35).

1- The standard error of mean



شکل 2- ترانسفکشن اسپرم‌های رنگ آمیزی شده با رودامین با استفاده از لیپوفکتامین
رنگ قرمز نشان دهند جذب DNA توسط اسپرم می‌باشد.

Figure 2- Transficion of spermatozoa stained Rhodamine with lipofectamine
The red colors revealed the uptake of DNA by spermatozoa.

علاوه بر تفاوت‌های بین گونه‌ای، از دیگر عوامل بسیار مؤثر در این زمینه متفاوت بودن نسبت اسپرم به ترانس ژن و نیز حجم محیط انکوباسیون اسپرم و ترانس ژن است. افزایش حجم محیط انکوباسیون بر تعداد کپی‌های ترانس ژن وارد شده به داخل اسپرم، به شدت مؤثر بوده است (30). مولکر و همکاران (16) به منظور انتقال ژن به اسپرم گاو از FuGene 6 استفاده کردند و کارایی روش انتقال ژن به واسطه اسپرم را مربوط به استفاده از ترکیبات ترانسفکشن و نوع سازه پلاسمید دانسته‌اند.

در مطالعات مختلف از محیط‌های مختلفی برای انکوباسیون اسپرم و ترانس ژن استفاده شده است (2، 3 و 16). بر این اساس، تعیین یک محیط مطلوب برای انکوباسیون اسپرم و ترانس ژن که اسپرم‌ها بتوانند تحرک خود را در آن محیط حفظ کرده و جذب ترانس ژن توسط آنها نیز به خوبی انجام شود، ضروری به نظر می‌رسد. حسینی پژوه و همکاران (17) با مطالعه بر روی اسپرم گوسفند گزارش کردند که زمان انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی می‌تواند در میزان جذب آن مؤثر باشد. در حالی که مایونی و همکاران (26) نشان دادند اگرچه افزایش زمان انکوباسیون باعث افزایش میزان جذب می شود اما اعتقاد آنها بر این است که افزایش زمان انکوباسیون باعث شروع روند فعالیت آندونوکلئازهای اسپرم می‌گردد.

بعضی مشاهدات نشان دادند که DNA خارجی غالبا روی غشای اسپرم متصل می‌شود و به داخل نمی‌رود (28). به طوری که چو و همکاران (9) با آنالیز LSC (Liquid scintillation counting) نشان دادند که اسپرم انکوبه شده با کمپلکس DNA/ لیپوزوم، DNA خارجی متصل شده به اسپرم با تیمار با DNase تجزیه شده و به شدت کاهش می‌یابد. در این آزمایش نشان داده شد که DNA خارجی تنها به صورت سازه‌ای به غشا اسپرم متصل شده و به داخل نرفته است. در حالی که گزارشاتی مبنی بر این که DNA خارجی می‌تواند به داخل هسته اسپرم نفوذ کند و حتی ممکن است به داخل ژنوم اسپرم وارد شود وجود دارد (37). فرانکولین و همکاران (13) نشان دادند که حدود 15 تا 23 درصد از DNA متصل شده به اسپرم به هسته اسپرم وارد می‌شود.

لاویترانو و همکاران (24) با بررسی سه گروه مختلف پروتئین‌های موجود در سطح سلول های اسپرم، مکانیسم اتصال DNA خارجی به سلول‌های اسپرم را بررسی کردند. گروه پروتئین‌های 30-35 کیلودالتونی تنها گروهی بودند که در بین گونه‌های مختلف پستانداران خاصیت الکتروفورتیک[1] خود را حفظ کرده و توانایی اتصال به DNA خارجی را داشتند. در مایع انزال

1- Electrophoretic

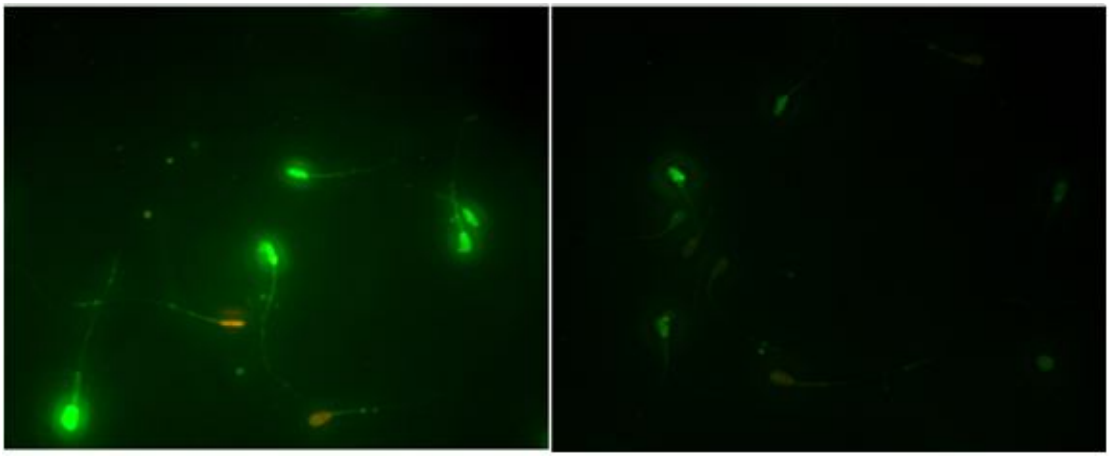
پستانداران، گروهی از گلیکوپروتئین‌ها که غلظت آنها بسیار زیاد است، ممانعت کننده اتصال DNA خارجی به ترشحات کیسه سمینال و دیگر غدد ضمیمه دارای خاصیت DNase بسیار قوی بوده که از دیگر عوامل ممانعت کننده انتقال ژن از طریق اسپرم محسوب می‌شوند. افزودن EDTA یا حرارت دادن ترشحات غدد ضمیمه باعث حذف خاصیت DNase آنها می‌شود. برای حذف این ممانعت کننده‌ها، شستشوی کامل اسپرم یک مرحله ضروری است. باسی و همکاران (4) بیان کردند که حذف منی در خوک اثر منفی بر پارامترهای تحرک اسپرم و قابلیت حیات آن نداشت. اما کنگ و همکاران (20) نشان دادند که مراحل شستشو و حذف مایع منی سبب کاهش تحرک اسپرم می‌گردد. لاویترانو و همکاران (25) توانستند ژن DAFh را با موفقیت به خوک منتقل کرده و خوک‌های تراریخته را ایجاد کنند. در 80 درصد از موارد، ترانس ژن وارد ژنوم خوک‌ها شده و در 64 درصد از خوک‌های حاوی ترانس ژن، بیان پایدار آن انجام شده بود. این مطالعه نشان داد که روش انتقال ژن به واسطه اسپرم یک روش بسیار موفق در انتقال ژن به خوک بوده که بازدهی آن نسبت به تمامی روش‌های دیگر زیادتر، مراحل انجام کار ساده‌تر و هزینه کمتری نیز داشته است. توانایی جذب DNA توسط اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است. این توانایی در اسپرم خوک‌ها بسیار زیادتر از موش‌ها گزارش شده است (14). یکی از دلایل این اختلاف را می‌توان در ابعاد مختلف سر اسپرم و ناحیه پشت آکروزومی که محل اتصال DNA خارجی به اسپرم است، در نظر گرفت (32).

آزمایش دوم: بررسی زنده مانی و تحرک اسپرم های ترانس ژن

نتایج مربوط به رنگ آمیزی آکریدین ارنج به منظور بررسی زنده مانی اسپرم‌های ترانس ژن نشان داد، اختلاف معنی‌داری در زمان انکوباسیون در اسپرم‌های ترانس ژن مشاهده نشد (اشکال 3 و 4).

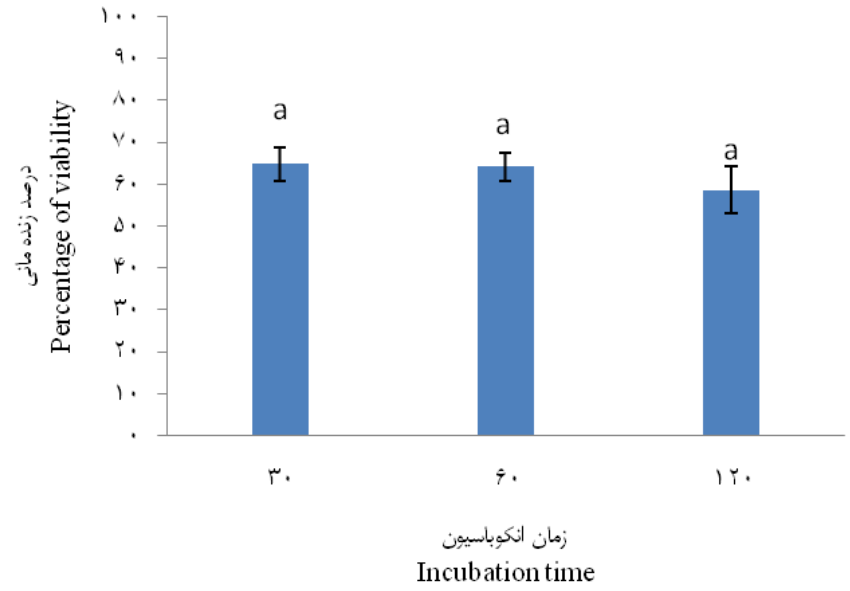
نتایج ارزیابی تحرک اسپرم در اسپرم‌های طبیعی و ترانسفکت نشان داد، تحرک اسپرم‌های ترانسفکت در زمان‌های 30 و 60 دقیقه اول از ترانسفکشن بطور معنی‌داری کمتر از اسپرم‌های طبیعی بود ($p<0.05$)، اما پس از 120 دقیقه اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد که این روند کاهشی مربوط به کاهش تحرک اسپرم‌های طبیعی در مدت زمان انکوباسیون بوده است (شکل 5).

کانواس و همکاران (7) ظرفیت اسپرم گاو برای حمل DNA با منشأ خارجی و ارتباط آن با عملکرد اسپرم را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق نشان داده شد که اسپرم گاو ظرفیت بالایی برای اتصال سریع با DNA خارجی دارد (حداکثر پس از 30 دقیقه) و نیمی از اسپرم‌های متصل به DNA زنده ماندند. انکوباسیون با DNA خارجی سبب کاهش قابلیت زنده ماندن و تحرک اسپرم و افزایش ناشی از نسبت سلول‌های آپوپتوتیک شد. آنها نشان دادند که هپارین سبب افزایش اختلالات و تعداد اسپرم متصل با DNA می‌شود. در نتیجه اسپرم‌های زنده می‌توانند به DNA خارجی متصل شوند و باعث ایجاد اثرات جزئی منفی روی بعضی از پارامترهای عملکردی اسپرم شوند، به طوری که این اثرات منفی نمی‌توانند خطر بالقوه‌ای روی باروری داشته باشند.



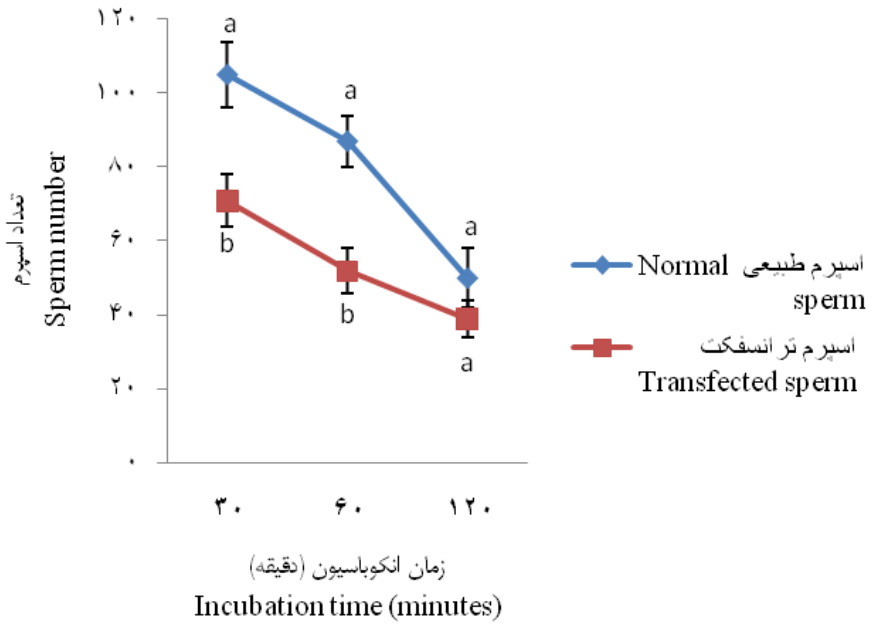
شکل 3- بررسی اثر جذب DNA خارجی بر روی زنده مانی اسپرم‌ها، در نتیجه رنگ آمیزی با رنگ آکریدین ارنج اسپرم‌های زنده به رنگ سبز و نوع مرده آنها به رنگ قرمز مشاهده شدند.

Figure 3- The effect of DNA uptake on sperm viability, by using acridin orange staining, the viable sperm was green and the dead ones were red.



شکل 4- درصد زنده مانی اسپرم‌های ترانس ژن در فاصله زمانی 30، 60 و 120 دقیقه

Figure 4- Percentage of viable transfected spermatozoa at 30, 60 and 120 minutes time intervals



شکل 5- مقایسه بین تحرک اسپرم‌های طبیعی و ترانسفکت در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 5- The difference between motility of normal and transfected spermatozoa at different incubation times

در حالی که کنگ و همکاران (20) نشان دادند که ورود DNA خارجی به اسپرم ممکن است باعث تغییر در سیستم دفاعی طبیعی اسپرم شده که در نتیجه آن منجر به نقص در عملکرد آن خواهد شد. روتمان و همکاران (31) گزارش کردند، افزایش تعداد کپی‌های ترانس ژن در هر اسپرم باعث فعال شدن اندونوکلئازهای داخل اسپرم می‌گردد که در نتیجه آن شکستن ترانس ژن و برخی نواحی ژنوم میزبان اتفاق افتاده و به دنبال آن سبب مرگ اسپرم‌های ترانسفکت شده خواهد شد. در خصوص تحرک اسپرم نیز گزارشات متناقضی وجود دارد، به طوری که برخی از مطالعات نشان دادند که کاهش تحرک اسپرم به دنبال انکوباسیون با DNA خارجی بوده، اما در برخی دیگر این کاهش تحرک دیده نشده است (2 و 3). احمدی و همکاران (1)، برای ارزیابی هرگونه شکستگی در دو رشته DNA اسپرم

موش‌ها از رنگ اکریدین ارنج استفاده کردند کـه ایـن رنـگ آمیـزی برای شناسایی آن دسته از اسپرم‌هایی که DNA آنها دچار شکستگی شده باشد متعاقب رنگ آمیزی به رنگ زرد تا قرمز فلوئورسنت نمایان می‌شود. در نتیجه آن دسته از اسپرم‌هایی که این حالت را نشان دهند به‌عنوان اسپرم‌های آسیب دیده در نظر گرفته می‌شوند (1).

نتیجه گیری کلی

نتـایج حاصـل از ایـن مطالعـه نشـان داد در حـدود 19 درصـد از اسپرم‌های حاصل از ناحیه اپیدیدیم بیضه گاو قـادر بـه جـذب DNA خـارجی بودنـد و افـزایش زمـان انکوباسـیون کمـپلکس DNA-لیپوفکتامین با اسپرم از 30 به 60 و یا 120 دقیقه اثر معنـی‌داری بـر روی ترانسفکشن اسپرم‌های مورد مطالعه نداشت. انتقال ژن به اسپرم گاو تأثیر معنی‌داری بر روی زنده مانی و تعداد اسپرم‌های پیش رونـده در مقایسه با اسـپرم‌هـای طبیعـی، 120 دقیقـه پـس از ترانسفکشـن نداشت. اما تحرک اسپرم‌های ترانس ژن در مقایسه با نوع طبیعـی آن به طور معنی‌داری تا 60 دقیقه اول پس از ترانسفکشن کاهش یافـت. به منظور بهینه سازی جذب DNA توسط اسـپرم پیشـنهاد مـی‌شـود علاوه بر استفاده از ترکیباتی مانند EDTA به منظور حـذف DNase، استفاده از سایر حامل‌ها مانند توربوفکـت و FuGene 6 نیـز بررسـی گردد.

منابع

1- Ahmadi, A., R. A. Sader khanlou., S. Salami, and A. Ahmadi. 2012. Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride. Tehran University Medical Journal, 70(4): 205-211. (In Persian).
2- Alderson, J., B. Wilson., G. Laible., P. Pfeffer, and P. L'Huillier. 2006. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. Animal Reproduction Science, 91(1): 23-30.
3- Anzar, M. and M. M. Buhr. 2006. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. Theriogenology, 65(4): 683-690.
4- Bacci, M. L., A. Zannoni., M. De Cecco., P. Fantinati., C. Bernardini., G. Galeati, and E. Seren. 2009. Sperm-mediated gene transfer–treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine. Theriogenology, 72(9): 1163-1170.
5- Bondioli, K. R., K. A. Biery., K. G. Hill., K. B. Jones, and F. J. De Mayo. 1990. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. Biotechnology Reading, Mass, 16: 265-273.
6- Brophy, B., G. Smolenski., T. Wheeler., D. Wells., P. L'Huillier, and G. Laible. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nature Biotechnology, 21(2): 157-162.
7- Canovas, S., A. Gutierrez-Adan, and J. Gadea. 2010. Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. Molecular Reproduction and Development, 77(8): 687-698.
8- Cappello, F., G. Stassi., D. Lazzereschi., L. Renzi., C. Di Stefano., G. Marfe, and M. Forni. 2000. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. Transplantation proceedings, 32 (5): 395-396.
9- Cho, H. Y., K. H. Chung, and J. H. Kim. 2002. Follow-up of exogenous DNA by sperm-mediated gene transfer via liposome. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 15(10): 1412-1421.
10- Damak, S., H. Su., N. P. Jay, and D. W. Bullock. 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. Nature Biotechnology, 14(2): 185-188.
11- Eghbalsaied, S. h., K. Ghaedi., S. M. Hosseini., S. Tanhaie., M. Forouzanfar., M. Hajian, and M. H. Nasr Esfahani. 2009. Selection of the most appropriate medium for assessing motility and DNA uptake of bovine spermatozoa. Yakhteh Medical Journal, 10(4): 266-271.
12- Epperly, J. M. 2007. Linker-based sperm mediated gene transfer method for the production of transgenic rat. MSc Thesis. University of Akron.
13- Francolini, M., M. Lavitrano., C. L. Lamia., D. French., L. Frati., F. Cotelli, and C. Spadafora. 1993. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. Molecular Reproduction and Development, 34(2): 133-139.
14- García-Vázquez, F., D. Gumbao., A. Gutiérrez-Adan, and J. Gadea. 2006. Use of flow cytometry to evaluate the capacity of boar sperm to bind to exogenous DNA of different sizes. Reproduction, Fertility and Development, 19(1): 316-316.
15- Hammer, R. E., V. G. Pursel., C. E. Rexroad., R. J. Wall., D. J. Bolt., K. M. Ebert, and R. L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315(6021): 680-683.
16- Hoelker, M., S. Mekchay., H. Schneider., B. Bracket., T. Gaylord., J. Dawit, and G. J. Danyel. 2007. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect

of transfection reagent and DNA architecture. Theriogenology, 67(6): 1097-1107.
17- Hoseini Pajooh, K., P. Tajik., and M. Karimipour. 2014. Dynamics of interaction between ram sperm with plasmid carrying human lysozyme gene in smgt. Iranian Journal of Comparative Pathobiology, 11(46): 1331-1344. (In Persian).
18- Houdebine, L. M. 2002. Animal transgenesis: recent data and perspectives. Biochimie, 84(11): 1137-1141.
19- Houdebine, L. M. 2003. Animal Transgenesis and cloning. Wiley Online Library.
20- Kang, J., H. Hyoun., R. Hatam., F. Arturo., M. Robert., M. Buhr, and S. P. Golovan. 2008. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. Theriogenology, 70(8): 1288-1296.
21- Khoo, H. W., L. H. Ang., H. B. Lim, and Wong, K. Y. 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture, 107(1): 1-19.
22- Kim, J. H., H. Jung., S. Hae., H. T. Lee, and K. S. Chung. 1997. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. Molecular Reproduction and Development, 46(4): 515-526.
23- Kuznetsov, A.V., I. V. Kuznetsova, and I. Y. Schit. 2000. DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova in vitro and in vivo. Molecular Reproduction and Development, 56(2): 292-297.
24- Lavitrano, M., M. Busnelli., M. G. Cerrito., R. Giovannoni., S. Manzini, and A.Vargiolu. 2005. Sperm-mediated gene transfer. Reproduction, Fertility and Development, 18(2): 19-23.
25- Lavitrano, M., M. Forni., M. Bacci., D. S. Laura., V. Carla., W. H. Vincenzo, and E. Seren. 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Molecular Reproduction and Development, 64(3): 284-291.
26- Maione, B., C. Pittoggi., L. Achene., R. Lorenzini, and C. Spadafora. 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. DNA and Cell Biology, 16(9): 1087-1097 .
27- Niu, Y. and S. Liang. 2008. Progress in gene transfer by germ cells in mammals. Journal of Genetics and Genomics, 35(12): 701-714.
28- Perry, A. C. F., T. Wakayama., H. Kishikawa., T. Kasai., M. Okabe., Y. Toyoda, and R. Yanagimachi. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 284(5417): 1180-1183.
29- Rexroad, C. E., R. E. Hammer., D. J. Bolt., K. E. Mayo., L. A. Frohman., R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1989. Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. Molecular Reproduction and Development, 1(3):164-169.
30- Rieth, A., F. Pothier, and M. A. Sirard. 2000. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. Molecular Reproduction and Development, 57(4): 338-345.
31- Rottmann, O. J., R. Antes., P. Hoefer, and G. Maierhofer. 1992. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. Journal of Animal Breeding and Genetics, 109(1-6): 64-70.
32- Sciamanna, I. P., B. Simona., Z. Laura., M. Germana., R. Anna., R. Giordano, and C. Spadafora. 2000. DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. Molecular Reproduction and Development, 56(2):301-305.
33- Shen, W., L. Li., Q. Pan., L. Min., H. Dong, and J. Deng. 2006. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. Molecular Reproduction and Development, 73(5): 589-594.
34- Wall, R. J., R. K. Paleyanda., J. A. Foster., A, Powell., C. Rexroad, and H. Lubon. 2000. DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments. Animal Biotechnology, 11(1):19-32.
35- Webster, N. L., M. Forni., M. L. Bacci., R. Giovannoni., R. Razzini., P. Fantinati, and M. R. Bianco. 2005. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. Molecular Reproduction and Development, 72(1): 68-76.
36- Zhao, Y., H. Wei., Y. Wang., L. Wang., M. Yu., J. Fan., and C. Zhao. 2010. Production of Transgenic Goats by Sperm-mediated Exogenous DNA Transfer Method. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23(1):33-40.
37- Zoraqi, G, and C. Spadafora. 1997. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. DNA and Cell Biology, 16(3):291-300.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 4, Winter 2017, p. 656-666

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 4، زمستان 1395، ص. 666-656

Transfiction of Holstein Bull Spermatozoa by Lipofectamine

A. Teymoornejad[1]- M. Zandi[2*]- M. R. Sanjabi[2]- K. Hoseini Pajooh[3]- H. Ofoghi[4]

Received: 27-09-2015
Accepted: 02-05-2016

Introduction A simple and efficient method for producing multi-transgenic animals is required for medical and veterinary applications. The principal technique for the production of transgenic animals is pronuclear microinjection, which has a low efficiency for the generation of transgenic farm animals expressing a single transgene. Recently, nuclear transfer has been used to clone large animals, and could allow multiple genetic manipulations to be undertaken in vitro, prior to a single nuclear transfer, rather than complex and time consuming breeding programs. However, at present the frequency of success in cloning large animals is very low and is very expensive. The production of transgenic livestock by sperm mediated gene transfer (SMGT) has a number of advantages compared to other transgenic techniques such as nuclear transfer and microinjection. Both nuclear transfer and microinjection techniques are technically demanding and labor intensive. In contrast, SMGT requires no sophisticated equipment or technical expertise. Furthermore, bovine genetics are distributed through sperm in the dairy industry consequently making it easy to distribute genetically modified sperm. SMGT is based on the ability of sperm to bind to exogenous DNA molecules and transfer it to the oocyte during fertilization. The major benefits of the SMGT technique were found to be its high efficiency, low cost and ease of use compared to other methods. SMGT was first described in a small animal model, with high efficiency reported in the mouse. Recently the technique has been successfully adapted and optimized for use in large animals. Studies have shown that spermatozoa from numerous species, including bovine, can bind and take up foreign DNA and transfer it to the embryo. In bovine studies, the efficiency of SMGT can vary widely depending on both the transgene and the gene transfer method. Liposomes have been shown to be particularly effective in transferring DNA into bovine sperm. However, not all embryos derived from transfected sperm contain the transgene, suggesting that mechanisms exist, which impede SMGT. The aim of this study was to investigate the possibility of gene transfer to bull spermatozoa by using lipofection.

Materials and Methods Ram testes collected from Meysam abattoir slaughterhouse immediately after slaughter and were brought to the laboratory in an ice chest. In the laboratory, the testes were rinsed twice with normal saline and were then trimmed to remove the extra testicular tissue and washed properly with saline containing 0.1% streptomycin sulphate. Connective tissue covering the cauda epididymis was removed by careful dissection, with care to avoid rupturing blood vessels or the epididymal duct. For detection of transfected spermatozoa, they stained with Rodamine. In order to transfection of sperm, 2 µg of Rodamine labeld DNA and 0.5 µl of TurboFect were diluted in 25 µl of transfection medium separately, and incubated for 5 min at room temperature. Then, the diluted DNA was added to diluted TurboFect (total volume=50 µl) and incubated for 20 min at room temperature. 1×10^6 sperm were added to 50 µl of DNA- TurboFect complexes and [5]mixed gently by rocking the plate back and forth. To evaluation of transfected spermatozoa motility, acridine orange staining was used. Each experiment was replicated at least three times, and for each replicate, at least 50 ES cell colonies were used. Data were analysed with a statistical software program (SPSS 16). Comparisons between two treatments and multiple numeric datasets were performed using t-test and one-way ANOVA followed by Duncan multiple-range test, respectively. Results are expressed as mean±SEM and statistical significance was accepted at $P<0.05$.

Results and Discussion Results showed that around 19 % of epididymal spermatozoa from the bovine testicles are able to take up foreign DNA and no significant difference was observed by increasing the incubation time of DNA- lipofectamine complex with spermatozoa from 30 to 120 minutes ($P>0.05$). The comparison of

1- Agricultural Research Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran,
2- Assistant Professor of Animal, Poultry and Aquatic Sciences Department, Agricultural Research Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran,
3- Assistant Professor, Research group of Bioenergy and Bioconversion Processes, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran,
4- Associate Professor, Research group of Medical and Pharmaceutical Biotechnology, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
(*-Corresponding Author Email: mz1075@yahoo.com Tel/Fax: +982156276639)

transfected and normal spermatozoa reveal that, motility of transfected spermatozoa at 60 minutes after transfection was significantly lower than normal ones ($p<0.05$), but there was no significant difference resulted after 120 minutes of transfection. Incubation of spermatozoa for 120 minutes after treatments resulted to impaired sperm motility in either groups. In conclusion, increasing the incubation time of DNA- lipofectamine complex with sperm and also the absorption of dead and live sperm had no effect on uptake of foreign DNA and also sperm motility was not affected by take up of foreign DNA by sperm.

Keywords: Bovine, Lipofectamine, SMGT, Sperm, Transfiction.