فهرست

سخن مترجمین ۷

فصل ۹: تولید موش‌های صحرایی تراریخته ۹

فصل ۱۰: تولید خرگوش‌های تراریخته ۳۷

فصل ۱۱: تولید ماهی تراریخته ۷۱

فصل ۱۲: تولید ماکیان تراریخته ۱۰۵

فصل ۱۳: تولید پریمات‌های تراریخته ۱۳۱

فصل ۱۴: تکنولوژی انتقال هسته در گاو، گوسفند و خوک ۱۶۱

فصل ۱۵: روش‌های جایگزین برای تراریختگی در گونه‌هایی از حیوانات خانگی ۱۷۵

فصل ۱۶: تحلیل فنوتیپ ۲۰۹

ضمائم ۲۳۶

منابع به ترتیب استناد در جدول A.۱۶،۱ ..... ۲۴۵

واژه‌یاب ۲۷۹

سخن مترجمین

اثری که پیش‌رو دارید ترجمه‌ی ویرایش سوم کتاب «فنآوری تولید حیوان تراریخته (راهنمای آزمایشگاهی)» است. امیدوارم که موضوعات آن برای پژوهشگران و دانشجویانی که با علوم مهندسی ژنتیک و بیولوژی تولیدمثل سروکار دارند و همچنین متخصصین بالینی مفید باشد. ویرایش سوم این کتاب در سال ۲۰۱۴ توسط جمعی از دانشمندان برجسته در دانشگاه‌های مطرح دنیا تألیف و در انتشارات الزویر به چاپ رسیده است. محتوای این کتاب از جنبه تئوری بسیار جامع و با قلم شیوا تألیف شده است و از جنبه عملی هم نویسندگان سعی نموده‌اند تا مراحل مختلف آزمایشگاهی تولید حیوانات تراریخته و تائید تولید آن را شرح دهند.

بخش اول این کتاب به مقدمه‌ی بر فنآوری تولید حیوان تراریخته و عوامل تأثیرگذار بر تولید آنها، هدف‌گیری ژن در سلول‌های بنیادی جنینی موش و طراحی ناقل‌های انتقال‌دهنده ژن و فنآوری انتقال هسته به سلول بنییادی جنینی پرداخته است. بخش دوم کتاب بحث ویرایش ژن و فنآوری‌های مرتبط با آن، تولید حیوانات مختلف تراریخته و نهایتاً فنآوری انتقال هسته در گاو، گوسفند و خوک و در بخش سوم کتاب به تحلیل فنوتیپ حیوانات تراریخته و تحلیل ادغام و بیان ژنها به کمک تکنیک‌های مولکولی و نهایتاً دستکاری در ژن‌های میتوکندری و انتقال آن به موشها پرداخته شده است.

مطالعه این کتاب برای تمام رده‌های علمی در رشته‌های مختلف مانند ژنتیک انسانی، بیولوژی تولیدمثل، پزشکی مولکولی، بیوتکنولوژی، زیست‌شناسی، ژنتیک مولکولی، ویروس‌شناسی، علوم آزمایشگاهی، سلول درمانی و مهندسی بافت و تمامی متخصصین گروه‌های مختلف بالینی مفید است و آنها را با جدیدترین و پیشرفته‌ترین فنآوری‌های تولید حیوان تراریخته جهت مطالعه بیماری‌های مختلف آشنا می‌کند.

ترجمه این کتاب گامی برای نشر آن به جامعه‌ی علمی کشور است تا در خدمت علاقه‌مندان قرار گیرد. ما نیز تلاش کردیم ضمن حفظ اثر نویسندگان، کتاب را با نگارش روان به فارسی درآوردیم. اشکالاتی ممکن است پیش روی خوانندگان محترم وجود داشته باشد که صمیمانه پوزش می‌طلبیم. از تمامی کارکنان محترم انتشارات رویان پژوه و تمامی عزیزانی که ما را در تهیه این کتاب یاری نمودند صمیمانه قدردانی و تشکر می کنیم.

مترجمین

پائیز ۱۴۰۰

فصل ۹

تولید موش‌های صحرایی تراریخته

۱. مقدمه

بیش از ۳۰ سال از زمان تولید موش‌های تراریخته می‌گذرد. با این حال جالب است که تزریق فیزیکی سکانس خطی در محلول بافر می‌تواند راه خود را در ژنوم پیدا کند و ادغام تصادفی چنین DNAهایی منجر به واحدهای ژنتیکی عملکردی می‌شود. این حقیقت که این مسائل رخ می‌دهند بسیار مفید می‌باشد. در سه دهه‌ی گذشته حیوانات تراریخته در نمونه‌های آزمایشی بسیاری استفاده شده‌اند که به میزان زیادی دانش ما را از عملکرد ژن بالا برده‌اند. استفاده از این تکنولوژی، بررسی اخلاقی ژن‌های انسانی را در حیوانات دست نخورده امکان‌پذیر کرده است و این یک رویکرد دارویی جدید را برای بیورآکتورها فراهم کرد، ذخیره غذایی ما را تغییر داده و ممکن است کاربرد نهایی جایگزینی را برای گیاهان تنباکو فراهم کرده باشد.

۲. اهمیت موش‌های صحرایی

روش‌های تولید موش‌های تراریخته به صورت روتین و گسترده‌اند. ولی موش‌های تراریخته، درحالیکه کاربرد گسترده‌ای دارند، کمتر در دسترس می‌باشند. این مایه شرمساری است زیرا موش صحرایی مدل مورد انتخاب در مطالعات بیماری انسانی است. بیش از یک قرن مقالات با داده‌های فنوتیپی از موش صحرایی منتشر شده‌اند. در ۳۰ سال گذشته فقط نام بیش از ۵۰۰۰۰۰ مقاله که از مدل‌های موش صحرایی استفاده می‌کنند در PubMed ذکر شده است. با بیش از ۲۵۰ نژاد موش صحرایی که شامل نژادهای همسان، کانژنیک، جهش یافته‌ها، تراریخته و جهش‌های کاهش عملکرد هدفمند می‌شوند. این‌ها حیوانات مهم در دسترس برای بررسی فیزیولوژی و بیماری قلبی ریوی، فیزیولوژی و بیماری کلیوی، تولیدمثل/غدد، ایمنی شناسی، سم شناسی، رفتار، اعتیاد، سرطان، دیابت و مسائل متابولیک دیگر، آرتریت و رشد عصبی و بیماری عصبی می‌باشند. در واقع برای بسیاری زمینه‌های زیست پزشکی، موش صحرایی برای داده‌های در دسترس جامع، اندازه مناسب یا به خاطر فیزیولوژی حیوان که شباهت نزدیکی با انسان دارد،

انتخاب می‌شود. موش صحرایی گونه‌ی منتخب آزمایشات ژن درمانی بویژه زمان دستکاری سیستم عصب مرکزی است.

استفاده از موش صحرایی به عنوان یک مدل اهمیت خاصی برای بررسی‌های بیماری و عملکرد قلبی دارد. در زمینه‌ی سکته و فشار خون بالا، موش‌های صحرایی از دهه‌ها قبل برای آموزش استفاده شده است. برای بررسی‌های عناصر مختلف فشار خون بالا، ۹ نژاد همسان ژنتیکی با فنوتیپ‌های تنظیم فشار شریانی وجود دارند. موفقیت اخیر در تحلیل چندتایی فنوتیپ‌ها که در آن‌ها صدها فنوتیپ و نشانگر موقعیتی با هم در بررسی‌های تفکیک مشترک مورد تحلیل قرار گرفتند اهمیت خاصی دارد. این رویکرد منجر به شناسایی تعداد زیادی مکان کروموزومی شد که ارتباط معناداری با فشار خون بالا داشتند. همزمان با دانش رو به افزایش براساس تکمیل ژنوم موش صحرایی، پیش‌بینی‌های نواحی کروموزومی انسانی و ژن‌های سینتنیک تأثیرگذار روی بیماری انسانی، انجام شدند.

موش صحرایی یک مدل مهم برای بررسی آرتریت و بیماری‌های خودایمنی بوده است. نژادهای همسان ژنتیکی بسیاری مربوط به این بررسی‌ها از جمله نژادهای کانژنیک، موتان‌های مرتبط مثل موش‌های نود بدون تیموس و نژادهای تراریخته مثل HLA-B27، TNF-alpha و غیره وجود دارند. نفوذ بیماری در این مدل‌های ژنتیک بالاست و انتشار جنسیتی بیماری در موش صحرایی بیشتر شبیه انسان است تا هر مدل حیوانی دیگری مثل موش خانگی.

موش صحرایی همچنان مهمترین مدل بررسی ریسک قرارگیری در معرض سم برای هم درمان‌ها و هم مواد شیمیایی تازه تولید شده‌ی دیگر می‌باشد. رشد فارماکوژنتیک و مصرف زیاد داروها در یک جمعیت سالخورده، استفاده از موش صحرایی را در این بررسی‌ها حتی مهم‌تر کرد. نیاز به چند گونه در ارزیابی ریسک، تأکید بیشتری روی موش‌های صحرایی در آزمایشات سم‌شناسی دارد. بررسی‌های مهم کلاسیک کارسینوژن‌ها و بیولوژی سرطان در موش‌های صحرایی انجام شده‌اند.

عوامل ایجاد کننده سرطان کبد، یک زمینه‌ی مهم است که موش صحرایی بیشترین اطلاعات را می‌دهد. کبد موش صحرایی با ضایعاتی واکنش می‌دهد که خیلی شبیه ضایعات دیده شده در انسان هستند. موش‌های کیمریک برای تعیین منشأ کلونال این ضایعات و سرطان‌های کبد استفاده شدند. کیمراز موش صحرایی منجر به مدل‌های مهم ایجاد اندام می‌شود. مدل‌های سرطان سینه در موش صحرایی نشانگر بسیار خوبی برای بیماری انسانی هستند و پاسخ هورمون و آسیب شناسی بافتی بسیار مشابهی دارند.

منابع ژنومیک برای بررسی مدل‌های بیماری انسانی در موش صحرایی، قدرتمند و همچنان در حال پیشرفت هستند. ژنوم کامل موش با ابزارهای انفورماتیک قابل ملاحظه‌ای در دسترس است. به عنوان نمونه پایگاه اطلاعاتی ژنوم موش صحرایی (http://rgd.mcw.edu/) عملکردهای متنوعی را در ارتباط با کشف و مقایسه ژنومیک فراهم می‌کند. پلی‌مرفیسم در ژن‌های مرتبط با قرارگیری در معرض سم انسانی

در موش‌های صحرایی چندین دهه بررسی شده است. چند نوآوری ملی برای ایجاد مراکز نگهداری و توزیع نژادهای موش صحرایی مهم با کیفیت میکروبی و ژنتیکی شناخته شده ازجمله بانک ژنوم وجود دارند.

۳. نقش‌های موش‌های صحرایی تراریخته

موش‌های صحرایی تراریخته در آزمایشات مهم متنوعی از ۲۰ سال قبل استفاده شده‌اند. ما در اینجا تنها چند زمینه را مورد بحث قرار می‌دهیم:تحقیقات فشار خون بالا، تحقیقات آرتریت و خودایمنی، سم شناسی و تحقیق سرطان.

A. مدل‌های فشار خون بالا

فشار خون بالا و سکته عوامل اصلی مرگ در سرتاسر جهان می‌باشند. مدل‌های حیوانی این بیماری برای حذف و از بین بردن آن اهمیت زیادی دارند. کلید این بررسی‌ها سیستم آنژیوتانسین-رنین است و موش‌های تراریخته اهمیت خاصی دارند. نشانه‌هایی وجود دارند که موشهای ناقل ژن رنین ۲، فشار خون بالای کاملی را نشان می‌دهند. موش‌های صحرایی تراریخته با ژن رنین انسانی برای بررسی وضعیت بیان ژن در فشار خون و برای ارزیابی دارو درمانی استفاده می‌شوند. این حیوانات نیز برای بررسی نقش رنین انسان در فشار خون بالا در طی بارداری استفاده شدند. تراریخته دوگانه‌ی حیوانی برای آنژیوتانسینوژن انسانی و رنین انسانی برای بررسی علت‌های صدمه‌ی اندام نهایی در فشار خون بالا استفاده شدند و این تعیین می‌کند که برخی از این تأثیرات از فشار خون مستقل هستند و اثر حفاظتی سایکلوسپورین را ثابت می‌کند. بررسی‌های بیشتر سیستم آنژیوتنسین-رنین در موش صحرایی منجر به اطلاعات جدید مهمی در مورد واکنش‌های استرسی قلبی عروقی شده‌اند.

B. مدل‌های آرتریت

انسان‌هایی با الل HLA-B27 از کلاس I سیستم سازگاری نسجی در مقابل پیشرفت آرتریت به عنوان قسمتی از یک کمپلکس بیماری چند اندامی، بسیار آسیب‌پذیرند. این بیماری‌ها که اسپوندیلوآرتوپاتی نامیده می‌شوند، با استفاده از موش‌های تراریخته بررسی شده‌اند، که HLA-B27 با آن‌ها ادغام شده است. فرآیند بیماری که در موش پیشرفت می‌کند مثل کمپلکس انسانی است، بویژه آرتوپاتی محیطی محوری و اگر یک نوع الل متفاوت برای تولید تراریخته استفاده شود و یا اگر HLA-B27 که یک جهش خاص داشته باشد استفاده شود، بیماری ایجاد نمی شود. این حیوانات همچنین به بیماری التهابی روده مزمن مبتلا می‌شوند و بررسی‌های دقیق پاتوژن‌های عفونی ویژه‌ی دخیل را امکان‌پذیر می‌کنند. موش‌های صحرایی تراریخته دارای الل HLA-B27 برای بررسی‌های مکانیسم آرتریت به عنوان مثال با تغییر انتقال پپتید در شناسایی CTL، استفاده شده‌اند. نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهند که بیماری بر پایه‌ی HLA-B27

ارتباطی با پپتیدهای اتصالی به مولکول کمپلکس سازگاری نسجی اصلی ندارد. شواهد اخیر بدست آمده از این موش‌های صحرایی برای توصیف رابطه‌ی بین سیستم گوارش و درگیری مفاصل در اسپوندیلو آرتوپاتی استفاده شده است.

C. مدل‌های کارسینوژنز

موش‌های صحرایی یک مدل مهم کارسینوژنز کبد را فراهم می‌کنند. یک مدل تراریخته کارسینوژنز کبد، آنالیز جهشی مقایسه‌ای مهار کننده‌ی تومور را امکان‌پذیر کرد و نشان داد که سرطان‌های کبد ایجاد شده در این حیوانات مستقل از جهش‌ها در سه ژن مهار کننده‌ی تومور مطالعه شده، بوجود آمدند. با این حال وقتی حیوانات با کارسینوژن‌ها مواجه شدند، جهش‌هایی در P53 شناسایی شد. مدل تراریخته با یک ترانس ژن متشکل از پروموتور آلبومین موش و آنتی‌ژن T بزرگ SV40 ایجاد شد. همه‌ی این حیوانات تراریخته دچار ضایعات کبدی می‌شوند که باعث ایجاد ضایعات بدخیم شدند که تشابه فنوتیپی با تومورهای کبدی ایجاد شده با مواد شیمیایی داشت. موش‌های صحرایی تراریخته حامل انکوژن T بزرگ SV40 با پروموتور کربوکسی کیناز فسفوانول پیروات ایجاد شدند. این حیوانات از ۵ تا ۸ ماهگی دچار کارسینومای پانکراس می‌شوند. موش‌های صحرایی تراریخته در حال حاضر برای تشریح جنبه‌های مولکولی کارسینوژنز پستانداران استفاده می‌شوند.

D. مدل‌های دیگر

۲۰ سال گذشته شاهد پیشرفت مدل‌های تراریخته در موش‌های صحرایی بوده است. بحث کامل در مورد آن‌ها فراتر از حوزه‌ی فصل حاضر است ولی یک لیست ناقص ممکن است مفید باشد. تراریخته apo A–I انسانی در بررسی متابولیسم لیپید و درمان کولستاز استفاده شد. متابولیسم پلی‌آمین در تراریخته (۱) N–استیل ترانسفراز اسپرمین/اسپرمیدین مورد تحلیل قرار گرفته است و مدل‌های پیوند قلبی ایجاد شدند که در آن‌ها قلب موش‌ها به آغازیان پیوند زده شدند و به اینصورت ارزیابی دفع فوق حاد امکان‌پذیر شد. اخیراً، ایجاد سلول‌های ES رده سلولهای جنسی از موش صحرایی با تراریخته برای تولید سلول‌های ترکیب رده جنسی ES GFP مثبت، ترکیب شده است و این دسترسی به ردیاب‌های سویه‌ی مهم را امکان‌پذیر می‌کند.

۴ـ تولید

تولید موش‌های صحرایی تراریخته بسیار شبیه موش‌های آزمایشگاهی است. روش‌های جداسازی تخم‌ها، تعیین بارداری و ریزتزریق DNA مشابه است. تفاوت‌های اصلی بین روش‌های تولید، تفاوت‌هایی در تحریک تخمک‌گذاری و کشت است. در کل، میزان تغییر شکل موش صحرایی پایین‌تر از موش است. درصد تخم‌های ریز تزریق شده که منجر به موش‌های صحرایی تراریخته می‌شود بین ۰/۲ ٪ و ۳/۵ ٪

تخم‌های منجمد شده در مرحله پیش هسته‌ای می‌باشد. این ظاهراً به نژاد موش صحرایی استفاده شده و کاربر بستگی دارد. تنوع زیادی در تنوع نژادی تخم‌ها بعد از ریزتزریق DNA وجود دارد.

A. تحریک تخمک‌گذاری

تقریباً همه‌ی تسهیلات تولید کننده‌ی موش‌های صحرایی تراریخته، از هورمون درمانی برای تحریک تخمک‌گذاری حیوانات دهنده استفاده می‌کنند. هدف، افزایش تعداد تخم‌های در دسترس برای دستکاری است. برای حداکثر کردن تخم‌های در دسترس، می‌توان بقاء تخم را بعداز ریز تزریق و یا توانایی رشد تخم‌های بدست آمده را کاهش داد. در کل، تحریک تخمک‌گذاری مستلزم مصرف گونادوتروپین سرمی بارداری (PMSG) ۴۸ تا ۵۶ ساعت بعد از مصرف گونادوتروپین کوریونیک انسانی (HCG) است. این یک روند موثر شناخته شده در موش‌های خانگی است ولی نتایج متغیری در موش‌های صحرایی دارد. منبع و روش آماده‌سازی هورمون‌ها برای نتیجه‌ی روند ضروری است ولی اغلب جزئیات دقیق منبع و روش‌های تولید ناشناخته‌اند زیرا هورمون را می‌توان از منابع طرف سوم بدست آورد. یک روش دیگر به طرز موفقیت‌آمیزی برای افزایش محصول تخم‌ها استفاده شده است. این روش از منابع مختلف هورمون محرک فولیکول (FSH) استفاده می‌کند که به طور مداوم توسط مینی پمپ اسمزی مصرف می‌شود.

در آزمایشگاه، ما از چند روش برای تحریک تخمک‌گذاری استفاده کرده‌ایم. در کل ما به طرز موفقیت‌آمیزی سرم ماده‌ی باردار را به عنوان یک منبع فعالیت محرک فولیکول ۴۷ تا ۵۱ ساعت و بعداً توسط HCG در موش‌های صحرایی جوان یا بالغ در چرخه‌ی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت روشنایی به کار برده‌ایم. بعد از تزریق دوم، موش‌های ماده با موش‌های نر بارور در کنار هم قرار گرفته و از لحاظ پلاک جفت‌گیری صبح روز بعد که تخم‌ها از لوله رحمی خارج شدند، بررسی شدند. بسته به نژاد، تکنیک و سن تغییراتی در میزان محصول تخم‌های تک سلولی از جفت‌گیری با موش‌های نر وازکتومی شده یا بارور وجود دارند. پروتکل معمول ما برای حیوانات جوان به این صورت است که IU PMS 15 به صورت IP بین ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰، سپس IU HCG 15 به صورت IP ۵۰-۴۷ ساعت بعد به موش‌های صحرایی ماده‌ی ۲۸ تا ۳۰ روز، تزریق می‌شود. این منجر به میانگین ۲۵ تخم در هر موش ماده‌ی PVG این برد می‌شود و نتایج ضعیف تری از موش‌های ماده‌ی SD اوت برد جفت‌گیری کرده با موش‌های نر SD وازکتومی شده بدست آمدند. برای حیوانات بالغ ما IU PMS 20 را در ۱۱۳۰-۱۰۰۰ به صورت زیرجلدی تزریق می‌کنیم. این ۶-۴ ساعت بعد از IU PMS 30 زیرجلدی و سپس HCG IU50 که ۴۹-۴۷ ساعت بعد به صورت IP تزریق می‌شود. این منجر به میانگین ۲۵ تخم در هر موش ماده‌ی PVG این برد جفت‌گیری شده با موش‌های نر وازکتومی شده و میانگین ۱۸ تخم در هر موش ماده‌ی PVG جفت‌گیری شده با موش‌های نر بارور شد. نتایج در موش‌های صحرایی SD اوت برد بسیار ضعیف ترند. ما از مینی پمپ‌های اسمزی زیرجلدی برای تزریق فولتروپین استفاده کرده‌ایم.