

مجله دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

سال ۶۰، شماره ۶، صفحات ۵۰۲ تا ۵۱۸، (۱۳۸۱)

## حیوانات ترانس ژنیک

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

### چکیده

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

## مقدمه

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

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

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

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

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

اولین بار در سال ۱۹۸۱ دانشمندی به نام Gordon و همکاران با استفاده از روش خرد تزریق DNA (DNA microinjection)، ژنی بیگانه را به درون ژنوم موش وارد کردند؛ بدین ترتیب نخستین پستاندار ترانس ژنیک شکل گرفت. پس از آن، این روش برای تولید شمار فراوانی از دیگر حیوانات ترانس ژنیک مانند موش، خرگوش، گوسفند و خوک به استخدام گرفته شد. طبیعتاً این روشها و فنون نیز توسعه فراوانی یافت و به طور مشخص و

بدین منظور فنون متعدد دیگری نیز ابداع گردید و به کار گرفته شد. با این همه بیشتر مطالعات ترانس ژنیک روی موش انجام گرفته است؛ این امر دلایل متعددی به ویژه موارد زیر دارد:

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

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

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

۴- دستاوردهای فراوان و رو به رشد در زمینه‌هایی مانند ژنتیک، فیزیولوژی، جنین شناسی، ایمنی شناسی و بیوشیمی موش. در سال ۱۹۹۷ و در پی یکلون سازی موفق یک پستاندار (به نام Bolly)، امکان ادغام فنون مربوط به ترانس ژنزیس و کلون سازی مهیا گردید. جزئیات نسبی این پیشرفتها، کاربردهای آنها و مقایسه روشهای مورد اشاره از مهمترین محورهایی است که در ادامه این نوشتار به آن پرداخته شده است.

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

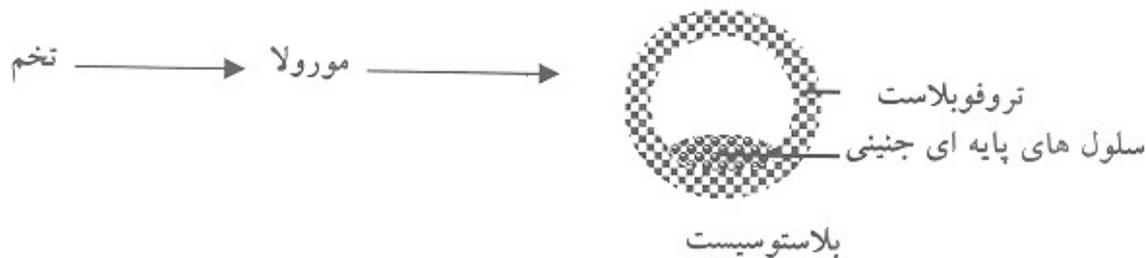
**ترانس ژن (Transgene):** ژنی بیگانه (Exogeneous) است که به شکل پایدار وارد ژنوم یک سلول یا موجود پیشرفته (Eukaryote) می‌شود. بدیهی است این ژن از منبع دیگری (به استثنای همان موجود) منشاء گرفته است.

**حیوان ترانس ژنیک (Transgenic):** حیوان واجد ژن بیگانه (ترانس ژن)، که علاوه بر ماده ژنتیکی خود، مقداری ماده ژنتیکی اضافی با منشاء خارجی را نیز دارا است. برای دستیابی به هدفهای مورد نظر در ایجاد این حیوانات، جانور ترانس ژنیک باید توانایی انتقال ترانس ژن به نسلهای آینده را دارا باشد؛ از این رو، ترانس ژن باید در دودمان‌های سلولهای جنسی (Germ lines) نیز وارد شود. بنابراین، واردسازی ترانس ژن به ژنوم سلولهایی که در پی آن بتوانند به انواع مختلف سلولها اعم از سوماتیک و جنسی تبدیل گردند، از هدفهای اصلی محسوب می‌شود. در عملیات ترانس ژنزیس (فنون مربوط به تولید حیوانات ترانس ژنیک) و به دلایل متعدد، پژوهشگران، بیشتر از دو گونه سلولی استفاده می‌کنند: اووسیت لقاح یافته و سلولهای پایه‌ای جنینی (Embryonic Stem Cells = ES Cells).

بخش درونی بلاستوسیست قرار دارند، سلولهای پایه‌ای جنینی گویند، این سلولها واجد خصلت چند توان هستند، بدین مفهوم که قادرند به تمام انواع مختلف سلولی تبدیل شوند. شایان تأکید است که یک سلول پایه‌ای جنینی، به تنهایی قادر به رشد در رحم نیست، بلکه برای تبدیل شدن به موجود بالغ باید درون یک بلاستوسیست قرار گیرد (شکل ۱).

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

چند توان (Pleuriptent): چنانچه می‌دانیم در پی تشکیل سلول تخم و پشت سر گذاردن مراحل اولیه تقسیم سلولی، مرحله ۳۲ سلولی، به نام بلاستوسیت خوانده می‌شود. سلولهایی را که در



شکل ۱- بلاستوسیست و سلولهای پایه‌ای جنینی

#### ۱- روش خرد تزریق پیش هسته‌ای:

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

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

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

#### روشهای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک :

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

۱- روش خرد تزریق پیش هسته‌ای (Pronuclear microinjection)

۲- روش ناقل رترو ویروسی (Retroviral vector)

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

۴- روش استفاده از کروموزوم های صنعتی مانند کروموزوم‌های صنعتی مخمر (Yeast Artificial Chromosomes = YAC) ویژه کروموزومهای صنعتی

پستانداران (Mammalian Artificial chromosomes = MAC)

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

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

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

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

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

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

## ۲- روش ناقل رتروویروسی:

در این روش، برای وارد کردن ترانس ژن به درون ژنوم، از ناقل رتروویروسی استفاده می‌شود. چنانچه می‌دانیم، ژنوم رتروویروس از جنس RNA می‌باشد، که پس از ورود به داخل سلول میزبان، در سیتوپلاسم سلول و با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase (RT) تبدیل به DNA شده و پس از مهاجرت به هسته، درون ژنوم الحاق می‌گردد و با رونویسی و ترجمه، اجزای کپسید و آنزیم‌های لازم برای عمل بسته بندی (Packaging) ساخته شده و رتروویروس‌ها از سلول میزبان جوانه می‌زنند. برای انجام عمل بسته بندی، در روی ژنوم رتروویروس، ردیفی بازی به نام Packaging Psi Signal حضور دارد، که در صورت فقدان این ردیف بازی، RNAهای ساخته شده قادر نیستند در درون کپسید قرار گیرند (شکل ۴).

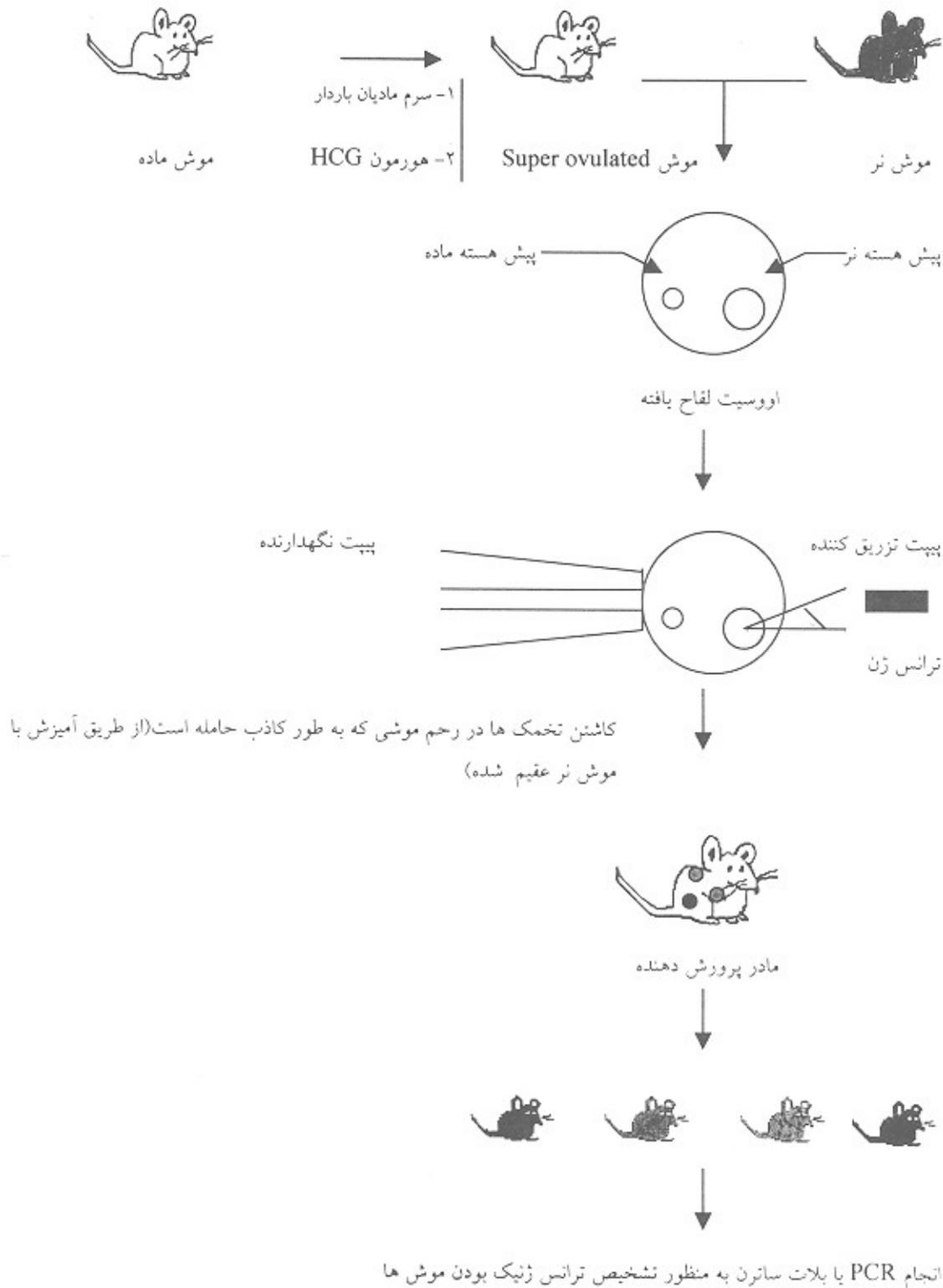
ماده است بنابراین در این روش، ترانس ژن بدون نیاز به ناقل و به کمک یک پیپت مناسب و با سر بسیار نازک (پیپت تزریق کننده) به درون پیش هسته نر که بزرگتر است و در زیر میکروسکوپ واضح تر دیده می‌شود، تزریق می‌گردد. ترانس ژن‌ها پس از ورود به هسته، از راه شکاف یا بریدگی‌هایی (Nicks) که به طور طبیعی در روی ژنوم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

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

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

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

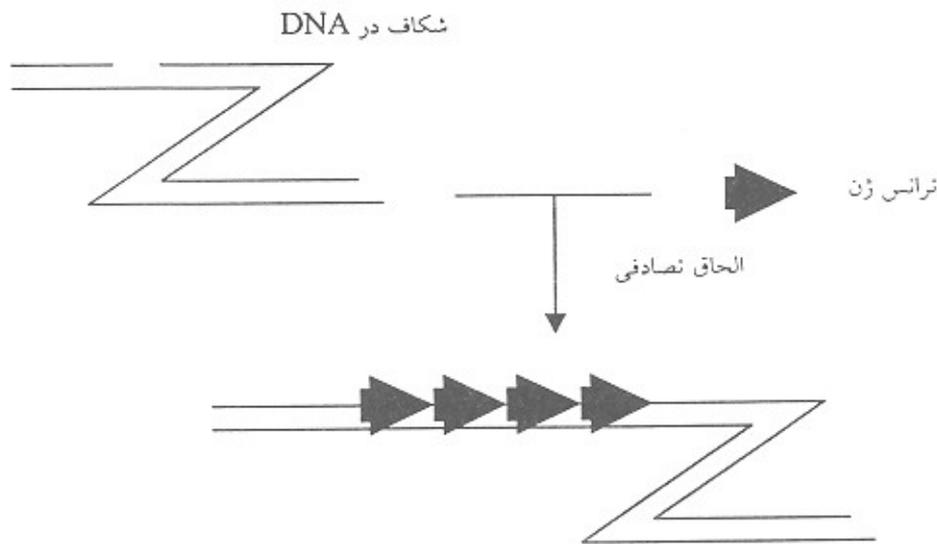
اگر چه روش خرد تزریق پیش هسته ای در زمره معمول ترین روش‌ها برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک به شمار می‌رود، معایب متعددی نیز دارد:



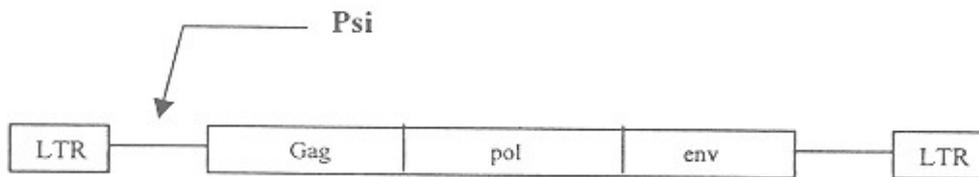
شکل ۲- فن خرد تزریق پیش هسته‌ای

مددکار (helper) استفاده می‌کنند. این ویروس ژنهای لازم برای ساختن اجزای کپسید را داراست و در عین حال فاقد علامت بسته بندی است و از این رو خودش نمی‌تواند داخل کپسید قرار گیرد.

در این روش، تمام ژنهای رتروویروس با ترانس ژن جایگزین می‌گردد، با این حال برای قرار گرفتن ترانس ژن در درون کپسید، به اجزای کپسیدی نیاز است که طبیعتاً ترانس ژن توانایی ساخت آن را ندارد. بدین منظور از یک رتروویروس



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



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

بدین ترتیب سلول مددکار که در محیط کشت است می‌تواند شمار زیادی رتروویروس تولید کند که به جای ژنوم اصلی، واجد ترانس ژن هستند.

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

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

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

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



تا کید می‌گردد که سلولهایی که ناقل را دریافت نکرده اند در محیط کشت حاوی G418 و گانسیکلوویر می‌میرند، زیرا فاقد ژن Neo<sup>r</sup> که موجب مقاومت به G418 می‌شود، می‌باشند ( شکل ۶ الف).

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

تشخیص حیوانات ترانس ژنیک: نظر به اینکه در ایجاد موجود ترانس ژنیک با این روش، دو دسته مختلف سلولی مشارکت دارند، موجود حاصل یک کای مرا (Chimera) است. توضیح بیشتر آنکه کای مرا یا شیمرا به مولکول DNA ی نوترکیب واجد ردیف‌های نوکلئوتیدی بیش از یک ارگانسیم اطلاق می‌شود. این نام از افسانه‌های یونانی گرفته شده است که بیانگر بزی است که دارای سری مانند شیر و دمی چون مار (ابلیس) می‌باشد. کای مری مناسب است که حاوی ترانس ژن در رده سلولهای جنسی خود باشد، یعنی سلولهای پایه‌ای جنینی که مهندسی ژنتیک شده و حاوی ترانس ژن باشند، در تشکیل رده سلولهای جنسی سهمیم شده باشند تا ترانس ژن بتواند به نسل‌های بعدی انتقال یابد.

برای تشخیص این امر، از رنگ پوشش استفاده می‌کنند. بدین صورت که رنگ پوشش موشی را که دهنده بلاستوسیست است، غالب انتخاب می‌کنند در حالی که رنگ پوشش موش دهنده بلاستوسیست برای کاشت در رحم (بلاستوسیستی که سلولهای پایه‌ای جنینی به آن تزریق شده است) مغلوب می‌باشد. در نسل اول، زاده کای مر فنوتیپ لکه لکه (مخلوطی از دو رنگ) را نشان می‌دهد. از آمیزش این موش کای مر با موشی که رنگ پوشش مغلوب دارد- و در صورتی که ترانس ژن در رده سلولهای جنسی نباشد - تمام زاده‌ها رنگ مغلوب خواهند داشت، اما اگر ترانس ژن در رده سلولهای جنسی موجود باشد، بدین معنی است که سلولهای پایه‌ای جنینی مهندسی شده که طبیعتاً حاوی ژن غالب رنگ پوشش بوده نیز در تشکیل گامت‌ها دخالت داشته‌اند و از این رو احتمال زایش موجوداتی با رنگ غالب نیز وجود دارد، که این زاده‌ها، در تمام سلولهای هسته‌دار خود، حاوی ترانس ژن می‌باشند (شکل ۸).

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

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

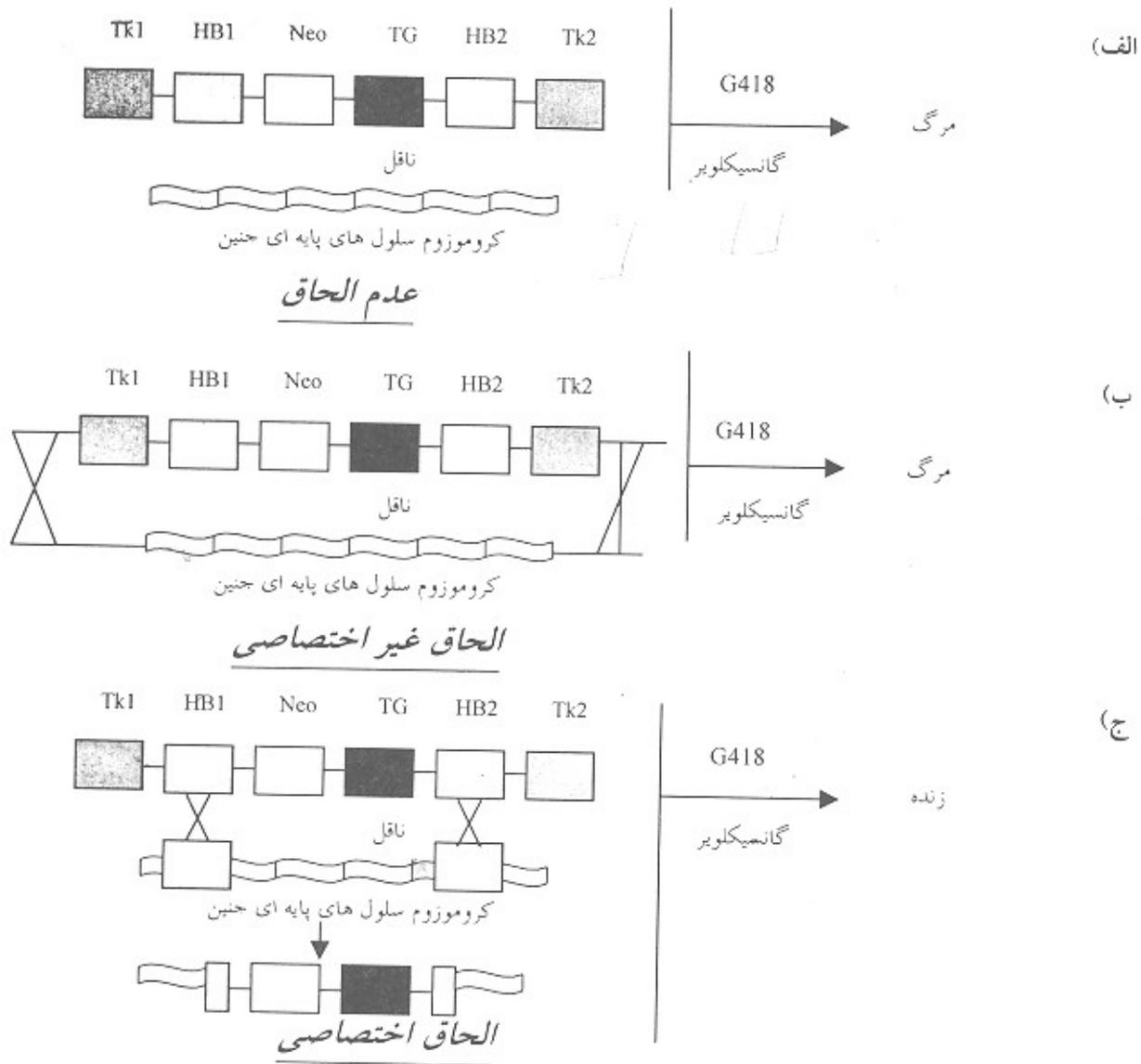
۴- TK: ژن ایجاد کننده آنزیم تیمیدین کیناز متعلق به ویروس هرپس سیمپلکس (Herpes Simplex Virus). این آنزیم روی ماده‌ای به نام گانسیکلوویر (Gancyclovir) اثر کرده و آن را فسفریله می‌کند. گانسیکلوویر فسفریله شده یک ممانعت کننده DNA پلیمرز به حساب آمده و مرگ سلول را سبب می‌شود. در این ناقل، این ژن نیز نقش نشانگر قابل انتخاب را دارد.

ترتیب قرار گرفتن این عناصر در روی ناقل، نقش اساسی در موفقیت این فن دارد. پس از قرار دادن سلولهای پایه‌ای جنینی در محیط کشت و انجام عمل ترانسفکشن (Transfection) با این ناقل، سه گونه سلول شکل خواهد گرفت:

- ۱- سلول هایی که فاقد ناقل هستند ( ناقل وارد آنها نشده است).
- ۲- سلولهایی که ناقل به طور تصادفی وارد ژنوم آنها گردیده است.
- ۳- سلولهایی که ناقل در مکان مورد نظر پژوهشگر، در ژنوم وارد شده است.

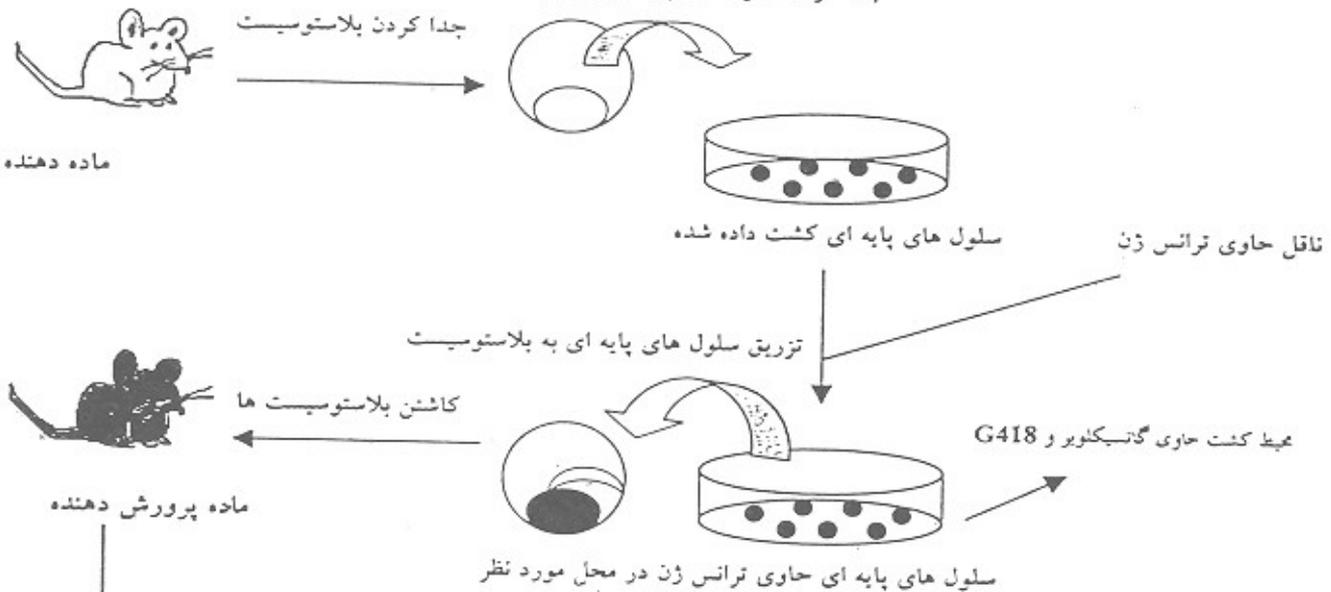
طبیعتاً تنها سلولهای نوع سوم، مناسب این فن می‌باشند. از این رو، از سیستم انتخابی موسوم به "سیستم انتخاب مثبت/ منفی" استفاده می‌کنند. اگر الحاق تصادفی (یعنی بدون استفاده از HBها) انجام گیرد، دو ژن TK نیز در امتداد سایر قسمتهای ناقل، وارد ژنوم می‌شوند. محیط کشت حاوی گانسیکلوویر و G418 می‌باشد؛ بنابراین با وجود ژنهای TK، گانسیکلوویر فسفریله شده و موجب مرگ سلول می‌گردد (شکل ۶-ب).

اگر الحاق با کمک کراسینگ اور و قسمتهای همساخت (HB) انجام گیرد، دو ژن TK حذف شده و تنها ژنهای TG ( ترانس ژن) و Neo<sup>r</sup> باقی می‌مانند. در محیط حاوی گانسیکلوویر و G418 این سلولها نمی‌میرند، زیرا Neo<sup>r</sup> موجب مقاومت به G418 می‌شود و TK نیز وجود ندارد که روی گانسیکلوویر اثر کند؛ بنابراین چنین سلولهایی که مورد نظر پژوهشگر هستند، در محیط کشت انتخاب می‌شوند (شکل ۶-ج).

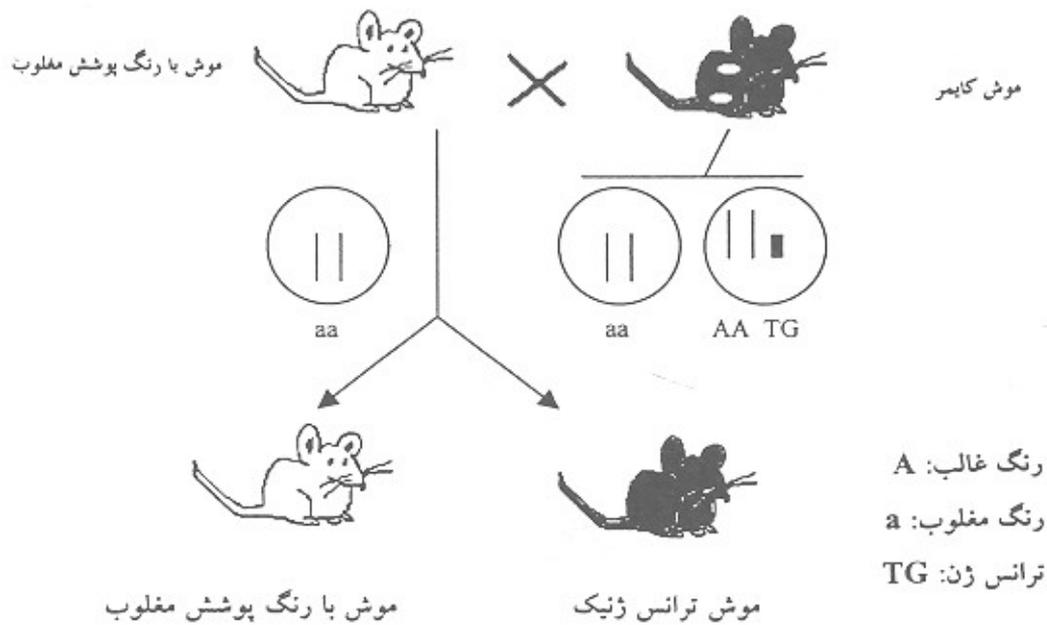


شکل ۶- روش انتخاب مثبت - منفی

جدا کردن سلول های پایه ای جنین



شکل ۷- روش استفاده از سلول های ES مهندسی ژنتیک شده



شکل ۸- ایجاد موش ترانس ژنیک از موش کایمر

طور دقیق شناخته نشده است و یا اینکه برخی از نواحی تنظیمی در فواصل دوری از ژن قرار گرفته‌اند، طراحی یک پروموتور کارا، از نظر فنی، کار آسانی نیست.

بزرگترین اندازه‌ای از DNA که باروشهای مرسوم می‌تواند وارد ژنوم موش گردد، حدود ۴۰ کیلو باز می‌باشد. بنابراین برای اینکه بتوان یک ترانس ژن را با نواحی کنترلی ویژه اش وارد ژنوم یک سلول کرد، ناقلین با ظرفیت بیشتر مورد نیاز می‌باشد. بدین منظور، از کروموزوم‌های صنعتی استفاده می‌شود؛ کروموزوم‌های صنعتی دارای تلومر، سانترومر و توالی بازی مورد نیاز برای همانندسازی هستند. با استفاده از این کروموزومها می‌توان قطعات بزرگ DNA از ۳۵۰ تا ۲۰۰۰ کیلو باز را وارد میزبان کرد؛ به نحوی که این قطعه شامل ترانس ژن و عناصر تنظیمی ویژه آن باشد.

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

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

#### الف) مزایا:

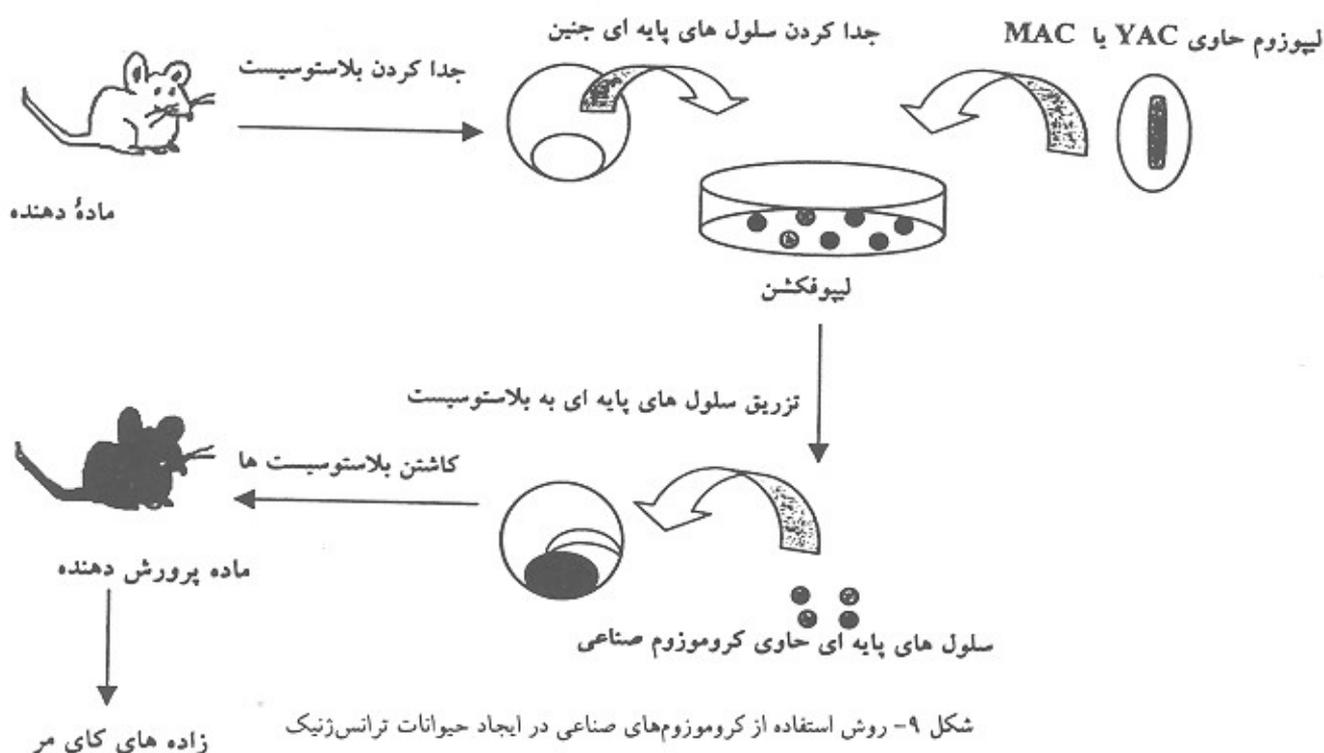
- ۱- سلولهای پایه‌ای جنینی موش به راحتی در محیط کشت رشد یافته و می‌توان دستکارهای متنوعی روی آنها انجام داد.
- ۲- سلولهای پایه‌ای جنینی مهندسی شده با تغییرات دلخواه را می‌توان انتخاب کرد.

#### ب) معایب:

- ۱- تاکنون تنها در موش، سلولهای پایه‌ای جنینی کارایی لازم برای این روش را داشته‌اند و در دیگر موجودات امکان دستکارهای دلخواه روی سلولهای پایه‌ای جنینی و ایجاد موجود ترانس ژنیک به این روش ظاهراً امکان پذیر نبوده است.
- ۲- موش حاصل، کای مر است و امکان دارد ترانس ژن در رده سلولهای جنسی اش وارد نشده باشد و نیاز به آزمون کردن ( آمیزش با موش با رنگ مفلوب ) دارد.

#### ۴- روش استفاده از YAC ها و MAC ها:

چنانچه می‌دانیم هر ژن دارای نواحی کنترلی و تنظیمی مانند پروموتور است که الگوی بیان ژن را از نظر مکان و زمان بیان تنظیم می‌کنند. بنابراین چنانچه یک ژن، بدون نواحی کنترلی ویژه‌ای وارد میزبانی گردد، ممکن است بیان نشود یا اینکه در مکان و زمان غیر مناسب بیان گردد. اما از آنجایی که نواحی پروموتوری بیشتر ژنها، به



این روش مناسب، بیان یا عدم بیان ترانس ژن را می توان مشخص کرد.

در این روش، ابتدا اسپرم ها در مجاورت غلظت مناسب مواد شوینده (Detergent) قرار می گیرند تا غشای اسپرم ها نفوذ پذیر گردد، سپس با ژن GFP مجاورت داده می شوند و در پی آن به کمک پیپت های ویژه ای، اسپرم به اووسیت لقاح نیافته تزریق می گردد. پس از سه روز، جنین ها به رحم مادر پرورش دهنده منتقل می شود. زمانی که به موش های ترانس ژنیک ایجاد شده پرتو UV تابانده شود، پرتو سبز از زیر پوستشان مشاهده می شود.

روش مذکور، بسیار جالب به نظر می رسد و سیستم کارایی برای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک در آینده محسوب می گردد. به ویژه که این روش می تواند بر شماری از معضلات روش خرد تزریق پیش هسته مانند غیر واضح بودن پیش هسته ها در برخی گونه ها - مانند گاو- غلبه کند. همچنین به خاطر امکان استفاده از سوزن بزرگتر از آنچه برای خرد تزریق به کار می رود، امکان استفاده از ساختارهای خیلی بزرگتری مانند MAC و YAC ها فراهم خواهد شد. با این همه، این روش هنوز در آغاز راه است و کارایی آن برای سایر موجودات (به استثنای موش) باید بررسی شود.

#### کاربردهای حیوانات ترانس ژنیک:

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

زمانی که کروموزوم های صنایعی وارد هسته می شوند، به درون ژنوم وارد نمی گردند، بلکه به شکل اپیزومی (Episome) وجود دارند و در خلال تقسیمات سلولی معمولاً به شکل طبیعی جدا می گردند. در وضعیتی که از کروموزوم های صنایعی برای انتقال ترانس ژن به موجود استفاده می شود، به جای واژه ترانس ژنیک از واژه ترانس کروموزومیک استفاده می شود. شایان ذکر است که در این روش نیز به دلیل ایجاد موش کای مر، همان معایب روش پیشین به چشم می خورد.

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

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

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

نخستین تجربه از این نوع، با استفاده از ژن رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز (Green Fluorescent Protein=GFP) انجام گرفت. زمانی که این ژن در بافت بیان شود بافت در زیر پرتوی ماورای بنفش (Ultra violet) UV، پرتو سبز ساطع می کند. با

## الف) اصلاح خصوصیات وراثتی:

از جمله مهمترین کاربردهای این حیوانات و فن ترانس ژنیزس، بهبود پایدار صفات مورد نظر در حیوانات مزرعهای مانند بازده شیر، خصوصیات پشم یا میزان تخم گذاری ماکیان می باشد.

روشی که به طور معمول برای بهبود صفات استفاده می شود، زادگیری انتخابی (Selective breeding) است، در این روش حیوانات برتر از نظر خصوصیات مورد نظر، در هر نسل انتخاب شده و آنها را با یکدیگر آمیزش می دهند. این کار، البته بسیار وقت گیر بوده و نسل های زیادی طول می کشد تا بتوان حیوانات با خصوصیات برتر را به طور نسبتاً پایدار ایجاد کرد.

با استفاده از روش ترانس ژنیزس و با شناسایی ژن مسئول خصوصیت مورد نظر و استفاده از آن به عنوان ترانس ژن، حیواناتی ایجاد می شود که آن ژن را به عنوان بخشی از ژنوم خود حمل می کنند. در پی آن، می توان در یک یا حداکثر دو نسل به آنچه که پیشتر در خلال سالها حاصل می شد، دست یافت.

علاوه بر این برای تغییر دادن محتوای شیر حیوانات نیز می توان از این روش استفاده کرد. به طور مثال برخی افراد قادر به تحمل لاکتوز شیر نیستند، اگر ژن لاکتاز را تحت پروموتوری که در بافت پستانی روشن می شود، به عنوان ترانس ژن استفاده کنیم، این ژن قادر به بیان و سنتز آنزیم لاکتاز در شیر خواهد بود؛ بنابراین با تجزیه لاکتوز، اینگونه افراد نیز قادر به استفاده از شیر خواهند بود. این روش همچنین برای ایجاد مقاومت به بیماریها در حیوانات مزرعهای با استفاده از ژنهای مقاومت به بیماریها کاربرد فراوانی دارد.

ب) استفاده از حیوانات ترانس ژنیک به عنوان کارخانه های دارو (بیوراکتورها):

چنانچه می دانیم در درمان برخی بیماریها به موادی مانند انسولین، عامل های انعقادی و هورمون رشد نیاز است. در گذشته این مواد از خون افراد تهیه می شد که با دو مشکل عمده مواجه بود:

الف) میزان ماده حاصل ناکافی بود.

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

پس از آن استفاده از فنون مهندسی ژنتیک و بهره گیری از سلولهای باکتری یا مخمر برای ساخت این مواد ابداع شدند، با این وجود این شیوه ها نیز معایبی مانند تخلیص مشکل مواد مورد نظر، ضرورت استفاده از تجهیزات پیچیده و پیشرفته و کاملاً شبیه نبودن

این مواد به مواد طبیعی (به دلیل عدم وجود سیستم های پردازش و تعدیل کنندگی (modifying systems) مناسب در باکتریها) دارند.

با روش ترانس ژنیزس می توان ژن مسئول سنتز ماده ای ویژه را جدا کرد و آن را به پروموتوری مناسب وصل نمود که بیان ژن را به طور مثال تنها در بافت پستانی موجب شود یعنی ویژه بافتی (Tissue Specific) باشد. بدین ترتیب، با بیان شدن ژن مورد نظر در بافت پستانی، پروتئین مورد نظر در شیر ترشح شده و براحتی می توان آن را از شیر تخلیص کرد.

از مزایای این روش می توان به خلوص آسان تر ماده مورد نظر، احتمال آلودگی کمتر، نگهداری راحت تر حیوان و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته اشاره کرد.

## ج) الگوهایی برای مطالعه بیماریهای انسانی:

حیوانات ترانس ژنیک را می توان به عنوان الگوهایی برای مطالعه انواع بیماریهای ژنتیکی انسان مورد استفاده قرار داد. در این روش، می توان ژن مسئول بیماری را کلون کرد، تغییرات دلخواه را روی آن انجام داد و سپس با فنون ترانس ژنیزس، حیوان ترانس ژنیک را ایجاد کرد و اثر تغییرات هدفدار اعمال شده روی ژن را در محیط *in vivo* و تحت کنترل قرار گرفته مطالعه نمود.

با توجه به همساختی زیاد بین ژنوم انسان و موش، استفاده از الگوهای موش ترانس ژنیک در فهم و درک بیشتر مکانیسم های بیماریهای انسانی، بسیار مدد کار می باشد.

## د) اندام های اهدایی برای پیوند به انسان:

اندام های اهدایی برای پیوند، به طور کلی با کمبود مواجه است. امکان استفاده از اندام های سایرگونه ها (Xenotransplantation) نیز به دلیل واکنش شدید سیستم ایمنی انسان و پس زدن بافت پیوند، ناممکن به نظر می رسد.

هرچند در خلال مطالعات متعدد، مشخص شده که اندام های خوک از نظر اندازه، فیزیولوژی و آناتومی به اندام های انسانی شباهت دارند با این حال هنوز قابلیت پیوند اندام های خوک به انسان وجود ندارد.

بنابراین چنانچه بتوان خوکهای ترانس ژنیک ایجاد کرد که به جای بیان مولکولهای مربوط به خوک در روی سطح اندام های خود، مولکولهایی از نوع انسانی روی سطح اندامهایشان داشته باشند و به طور مثال، به جای ژنهای سازگاری نسجی (Major Histocompatibility Complex = MHC) خوک، از ژنهای

ژنیکی که به عنوان الگوهای ویژه بیماریها تولید می‌گردند، به نحوی طراحی می‌شوند که تا حد امکان تمام نشانویژگیهای مرتبط با آن بیماری را نشان دهند، بنابراین این حیوانات احتمالاً از درد و رنج ناشی از آن بیماری نیز در امان نخواهند بود.

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

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

### کلون سازی:

تا سال ۱۹۹۷، مطالعات ترانس ژنریس و کلون سازی، به طور مستقل از هم پیش می‌رفتند، اما در این سال، تولد Dolly (اولین پستاندار کلون شده) و پس از آن، Polly (اولین پستاندار ترانس ژنیک با کمک فن انتقال هسته)، دیدگاه دانشمندان را نسبت به این دو فن آوری کاملاً متحول ساخت، به نحوی که این دو روش هم اکنون در ارتباط نزدیکی با هم می‌باشند.

چنانچه می‌دانیم، واژه کلون سازی مفاهیم متعددی دارد که در این مقاله، منظور از آن ایجاد موجوداتی است که از نظر ژنتیکی کاملاً همسان باشند. امروزه، این کار با استفاده از انتقال دادن هسته یک سلول بدنی (سوماتیک) به درون سیتوپلاسم یک اووسیت که هسته اش خارج شده است انجام می‌گیرد. این فن تحت عنوان "انتقال هسته ای" (Nuclear Transfer) نامیده می‌شود، و با کمک این فن، اولین پستاندار کلون شده به نام دالی در سال ۱۹۹۷ با به عرصه حیات گذاشت.

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

### هـ) خارج نمودن ژنهای زیان آور:

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

### حیوانات ترانس ژنیک و ملاحظات اخلاقی:

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

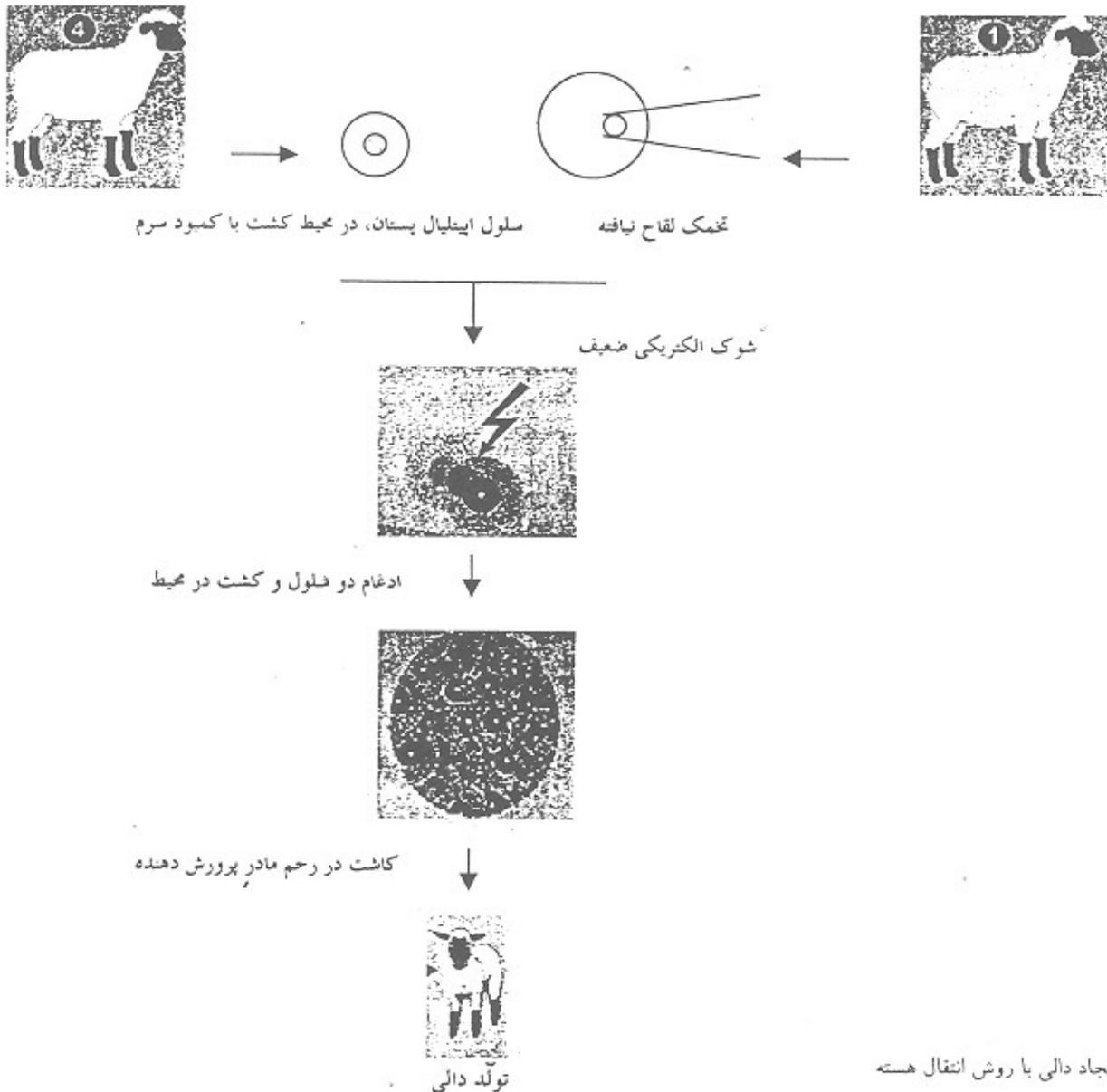
ملاحظات اجتماعی و اخلاقی اینگونه پژوهشها، و بحث تفضیلی پیرامون کاربردها، چشم اندازها و چالشهای پیش رو، البته که مقاله مستقلی را می‌طلبد و در این جا تنها می‌توان به طور بسیار گذرا و ناقص، نیم نگاهی به این موضوع بسیار با اهمیت انداخت: بین سالهای ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۹ تنها درکشور انگلیس، تعداد حیوانات ترانس ژنیک که در پژوهشها مورد استفاده قرار گرفتند، بیش از ۱۰ برابر افزایش داشت (از ۴۸۲۵۵ رأس به ۵۱۱۶۰۷ رأس): افزایش استفاده فزاینده از حیوانات ترانس ژنیک، به دلایل متعددی موجب اعتراض برخی از پژوهشگران و مردم گردیده است. از نظر برخی صاحب نظران، تولید حیوانات ترانس ژنیک می‌تواند سلامتی این حیوانات را از جنبه‌های مختلف مورد تهدید قرار دهد. به طور نمونه چنانچه پیشتر اشاره شد، شماری از روشهای ایجاد حیوانات ترانس ژنیک به نتایج غیر قابل پیش بینی منجر می‌شود این مسئله به دلیل دخول ژن بیگانه در مکان نادرستی از ژنوم حیوان می‌باشد، اینگونه حیوانات معمولاً از بیماریها و اختلالات متعددی رنج می‌برند. علاوه بر این حیوانات ترانس

خالی تخمک مورد اشاره و با ضربه ضعیف الکتریکی موجبات ادغام آنها فراهم آمد.

سلول ادغام شده، حدود ۶ روز در محیط کشت رشد یافته و جنین حاصله به رحم یک گوسفند از نژاد Black face ewe انتقال یافت. پس از ۱۴۸ روز دالی بدنیا آمد که هم از نظر ژنتیکی و هم از جهت فنوتیپی با گوسفندی که سلول اپیتلیال پستانی را از آن گرفته بودند، یکسان بود ( شکل ۱۰).

ایجاد دالی با فن انتقال هسته:

با برداشت سلولهای اپیتلیال از پستان یک گوسفند از نژاد Finn Dorset ewe، این سلولها در محیط کشت با کمبود سرم قرار گرفتند. کمبود مواد غذایی موجب می‌گردد که سلولها به مرحله  $G_0$  (خاموشی) - در چرخه سلولی - وارد شوند. همزمان یک تخمک لقاح نیافته از گوسفندی از نژاد Black face ewe اخذ شد و با کمک یک پیپت، محتویات هسته‌اش خارج گردید. با مجاورت دادن سلول اپیتلیال پستان با سیتوپلاسم



شکل ۱۰- ایجاد دالی با روش انتقال هسته

همه با بیشتر ژنها خاموش بوده و فرصت بیشتری برای دوباره برنامه ریزی (Reprogramming) ژنها وجود دارد. به بیان دیگر، فرصت بیشتری هست تا شماری از عوامل سیتوپلاسمی روی ژنها اثر کرده و آنها را به نحوی برنامه ریزی کنند که بتوانند دوباره خاصیت پس توانی خود را به دست آورند.

دلیل قرار دادن سلول اپیتلیال در محیط کشت با کمبود سرم این است که چنانچه سلول در مرحله S یا مرحله  $G_2$  باشد، پس از وارد شدن به سیتوپلاسم تخمک (egg) احتمال بروز ناهنجاریهای تعدادی کروموزومی زیاد می‌شود. اما چنانچه هسته در مرحله  $G_0$  باشد، با سیتوپلاسم تخمک کاملاً سازگار است زیرا

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

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

### کاربردهای کلون سازی:

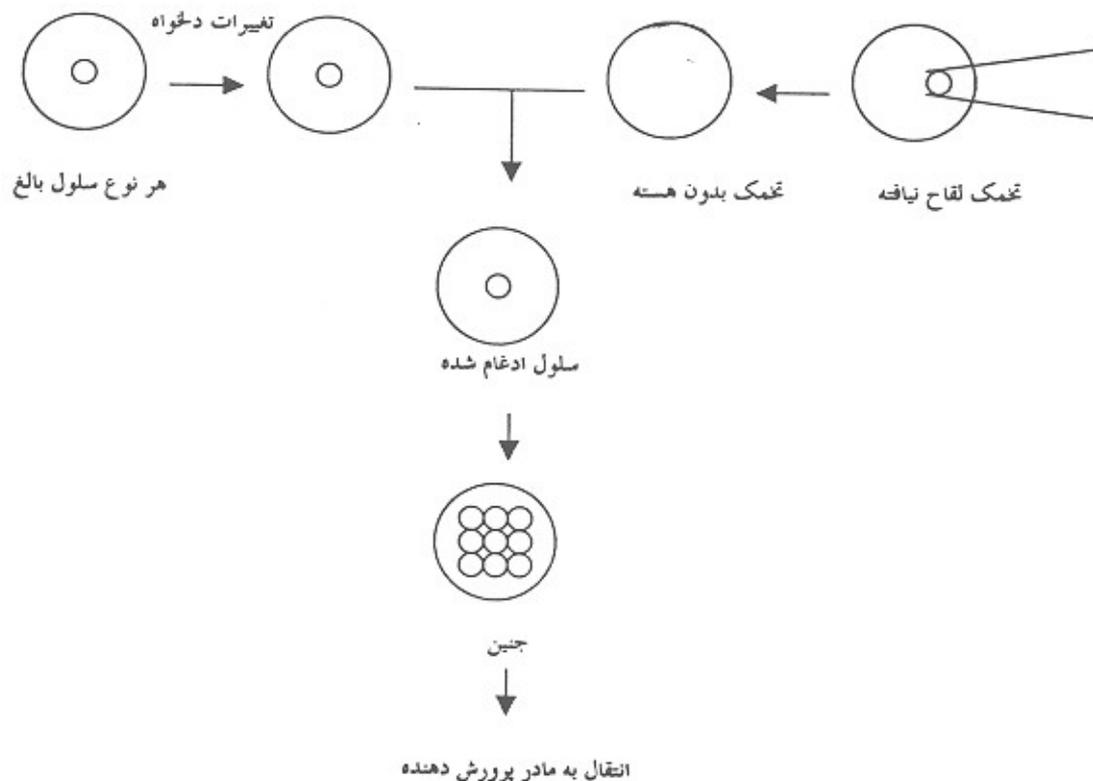
با تلفیق فنون کلون سازی و ترانس ژنزیس، تمام کاربردهای ذکر شده در مورد فن ترانس ژنزیس، در مورد روش کلون سازی نیز قابل تعمیم است. علاوه بر این، استفاده از فن کلون سازی در مطالعات مربوط به مراحل رشد و نمو بسیار حائز اهمیت است. اینکه چگونه ژنوم یک سلول تمایز یافته می‌تواند خصوصیات دوران جنینی خود یعنی بس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

### مقایسه کلون سازی و ترانس ژنزیس:

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

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

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



شکل ۱۱- تلفیق فنون کلون سازی (انتقال هسته) و ترانس ژنریس

## منابع

- Barnum, Susan R, Biotechnology: an introduction. Canada, Wadsworth Publishing Company, 1998.
- Glick, B.R & Pasternak, J.J, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Ontario, Canada, ASM Press, 479- 505, 1994.
- Strachan, T., Read, A.P, Human Molecular Genetics,UK, BIOS , 491-513, 1999.
- Butler, D.,& Wadman, M., Calls for cloning ban sell science short. Nature; 386:8-9, 1997.
- Campbell K.H.S., Mc Whir j., Ritchie W.A. & Wilmut I. Sheep Cloned by Nuclear Transfer from a Cultured cell Line. Nature; 380:64-66 , 1996.
- Kahn A., Clone mammals Clone man?, Nature, 386:119, 1997.
- Lutz D., Hello, Hello, Dolly, Dolly. The Sciences, May/ June: 10-11, 1997.
- Solter D., Lambing by Nuclear Transfer. Nature, 380: 24-25, 1996.
- Stewart C., An udder way of making Lambs, Nature, 385: 769 – 771, 1997.
- Wadman M., Cloning for research should be allowed, Nature, 388: 6, 1997.
- Wadman M., Republicans Seek to Widen Cloning ban, Nature, 387:748, 1997.
- Wadman M., US panel to back longer cloning ban, Nature, 387: 217- 218 , 1997.
- Wadman M., US to tighten Protection of Medical data, Nature, 388: 611, 1997.
- Wilmut I., Schnieke A.E., Mc Whir j., & Kind A.j, Campbell & K.H.S., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, Nature, 385: 810- 813 , 1997.
- Arthur C. & Laurence j. Cloning: questions and answers, [on – line]. Available on the www: url: <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning/sindyq&a.html> , 1997.

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

17. Wilmut, I. Potential benefits of cloning and Nuclear Transfer. [on-Line]. Available on the www: url: <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning/nt-benefits2.html>, 1997.

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

19. Zinnen, T.M. Cloning and Transgenic animals: the influence of technical confluences. [on-Line]. Available on the www: url: <http://www.accessexcellence.com/AB/BA/casertudy4.html>, 2001.

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

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

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

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

24. Roslin Institute online. Nuclear Transfer: a brief history. [on-Line]. Available on the www: url: <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning/nt.history2.html>, 1997.

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

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

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

28. The cloning of Dolly and other mammals. [on-Line]. Available on the www: Url: <http://www.biology.iupui.edu/biocourses/Bio1540/16cloning2k.html>, 2000.

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

30. How dolly was cloned?. [on-Line]. Available on the www: Url: <http://www.humancloning.org>, 2001.

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

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

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

۳۴- نوری دلونی، محمد رضا، خسروی نیا، سامیه و مجید فر، فرهنگ (ترجمه همراه با اضافات)، فرهنگ مهندسی ژنتیک (نویسنده اصلی: اولیور، استفن و وارد، جان، ام)، انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، پاییز ۱۳۷۳.

۳۵- طباطبائی، مجتبی، نوری دلونی، محمدرضا و تقی بیگلر، چنگیز (ترجمه). بیوتکنولوژی مولکولی (نویسنده اصلی: پرایمرز، اس.بی) انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، زمستان ۱۳۷۲.

۳۶- نوری دلونی، محمدرضا، مهندسی ژنتیک، بیوتکنولوژی و جهان اسلام، امید، اولین نشریه علوم پایه پزشکی دانشگاههای علوم پزشکی کشور، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی مشهد، شماره ۶ و ۷، پاییز و زمستان، صفحات ۳۸-۳۱، ۱۳۷۷.