مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۳، ۲۵۴-۲۴۵

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,3:245-254, 2014

ترانسفکشن اسپرم انزالی گوسفند با پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی

خسرو حسینی پژوه[1*] پرویز تاجیک[2] مرتضی کریمی پور[3] مهدی بهدانی[3] مجتبی داوودی[4]

۱) پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی وصنعتی ایران، تهران - ایران

۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۳) گروه پزشکی مولکولی، موسسه پاستور تهران، تهران - ایران

۴) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۳۰ اردیبهشت ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۴ تیر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: انتقال ژن بواسطه اسپرم به عنوان یک روش ساده و ارزان برای تولید جانوران تراریخته مطرح شده است. **هدف:** هدف از این تحقیق بررسی جذب پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی توسط اسپرم انزالی گوسفند و اثر زمان انکوباسیون و حضور مایع منی در میزان وشدت جذب این پلاسمید و تحرک اسپرم‌ها بود. **روش کار:** درآزمایش اول از ۳ قوچ و ۲ بار از هر قوچ، به روش الکتریکی اسپرم تهیه‌شده و پس از شستشو و حذف مایع منی، $10^6 \times 1$ اسپرم با ng ۱۰۰ پلاسمید pEGFP-IRES-hLys نشان دارشده با ماده فلورسنت رودامین برای ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با میکروسکوپ فلورسنت از نظر تعداد وشدت جذب پلاسمید و تحرک بررسی شدند. برای بررسی ورود DNA خارجی به اسپرم، نمونه‌های اسپرم بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون تحت تیمار با DNase قرار گرفتند. درآزمایش دوم اثر وجود مایع منی در جذب pEGFP-IRES-hLys، پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه انکوباسیون بررسی شد. **نتایج:** تعداد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند وشدت جذب با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می یافت اما تنها تا ۳۰ دقیقه این افزایش معنی دار بود ($p<0/05$). متوسط درصد جذب در ۱۲۰ دقیقه ۶۰/۱۶ بود تحرک کل و پیش رونده اسپرم‌های انکوبه شده با پلاسمید کاهش یافت اما هیچ اسپرم دارای جذب در ناحیه پشت آکروزوم متحرک نبود. پس از تیمار با DNase وجود باز تاب فلورسنت در ناحیه پشت آکروزوم نشان دهنده ورود پلاسمید به سلول بود. وجود مایع منی باعث کاهش میزان وشدت جذب پلاسمید و کاهش تحرک اسپرم‌ها شد. **نتیجه گیری نهایی:** اسپرم انزالی گوسفند می تواند به میزان بالایی پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی را به خود جذب کند. اما هیچ اسپرم ترانسفکت‌شده‌ای متحرک نبود. انکوباسیون با مقادیر کمتر از ng ۱۰۰ پلاسمید و زمان‌های کمتر ممکن است بتواند اسپرم‌های متحرک حاوی پلاسمید به دست دهد.

واژه‌های کلیدی: لیزوزیم انسانی، گوسفند، انتقال ژن به اسپرم

مقدمه

توانایی اسپرم در جذب خود به خود DNA و سپس به داخل بردن آن، استفاده از اسپرم برای انتقال ژن به تخم را به عنوان یک روش ساده و ارزان مطرح کرده است (۵). Camaioni در سال ۱۹۹۲ نشان داد که به دنبال گرمخانه‌گذاری اسپرم گاو و خوک با پلاسمید برچسب خورده با thymidin tritiated، ناحیه پشت آکروزومی در ۳۹٪ تا ۷۸٪ موارد این اسپرم‌ها برچسب خورده بود(۶). با تکرار آن آزمایشات نشان داده شد که این کار واقعاً عملی است(۲۵). در این آزمایش میزان ورود DNA به اسپرم یکنواخت بود (۹۰٪) اما نسبت ایجاد جنین های ترانسژنیک در بررسی به روش ساترن بلاتینگ بسیار متغیر بود (۰-۱۰۰٪، متوسط ۷/۴٪). در خوک و با استفاده از این روش Lauria مشاهده کرد ۱۳٪ نوزادها ژن خارجی را در خود داشتند اما هیچ پروتئینی تولید نکردند که نشان دهنده موزاییک بودن آنها بود (۲۰). این روش از زمان اولین گزارش تا کنون در حیوانات مختلف و در آزمایشگاه‌های متعددی انجام شده است. اتصال و ورود DNA خارجی به اسپرم موش (۲۳)، خروس (۳۹)، قوچ و گوزن(۸)، گاو (۳،۳۳)، خوک(۲۲)، اسب، گربه (۲۸)، ماهی (۱۹،۲۷) و انسان (۶) گزارش شده است. اما نتایج به دست آمده بسیار متفاوت و ناهمخوان بوده است (۳۷) لذا کارایی SMGT هنوز مورد مناقشه است و روش انتقال DNA خارجی به تخم نیز هنوز به خوبی درک نشده است میزان موفقیت این روش در حیوانات مختلف متفاوت است. انتقال با موفقیت بسیار زیاد یعنی ترانسژنیک بودن تا ۸۰٪ نوزادها در خوک گزارش شده است. در گاو با این روش رویان ترانسژنیک (۱۳،۱۷،۲۸،۳۲،۳۸) یا گوساله ترانسژنیک (۳۰،۳۳،۳۵) به دست آمده است. اما کارایی این تکنیک کاملاً پایین بود. اختلاف شدیدی بین آزمایشگاه‌های مختلف وجود داشته است. علاوه بر تفاوت در گونه حتی تفاوت میزان موفقیت در آزمایشگاه‌های مختلف و یا حیوان به حیوان نیز گزارش شده است.

مطالعات کمی در این زمینه در گوسفند انجام شده است و گزارش بسیار محدودی در بررسی ترانسفکشن اسپرم و استفاده از این روش موجود است(۲۸،۲۹). در این مطالعه جذب پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی توسط اسپرم انزالی گوسفند و اثر زمان انکوباسیون و محیط انکوباسیون در میزان و شدت جذب بررسی شده است.

مواد و روش کار

ساخت سازه ژنی: جهت ساخت سازه ژنی pEGFP-IRES -Lys، ژن کد کننده لیزوزیم انسانی بر اساس توالی ارائه شده در ژن بانک که در

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۵۵۶۲۷۶۶۳-۰۲۱، نمابر: ۵۵۶۲۷۵۵۱۰-۰۲۱ Email: pajooh@irost.ir

ابتدای آن سایت XhoI و در انتهای آن سایت برش آنزیمی EcoRI قرار داده شده بود، توسط شرکت Gen cast در پلاسمید PUC ساخته شد. ژن لیزوزیم انسانی (LYS) با دو آنزیم XhoI و EcoRI، برش خورده شد و به پلاسمید pEGFP-IRES هضم شده با همان آنزیم‌ها متصل شد و در باکتری TOP10 کلون گردید. همچنین جهت تأیید سالم بودن توالی insert و این که این توالی همان توالی کد کننده لیزوزیم انسانی است، قطعه insert پلاسمید استخراج شده توسط شرکت ژن فن آوران تعیین سکوانس شد.

جهت ارزیابی عملکرد پلاسمید تهیه شده و اطمینان از کارایی آن سلول‌های رده HK293 توسط این پلاسمید ترانسفکت شدند. عمل ترانسفکشن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen - 2000 Lipofectamine™) و طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد که به طور مختصر بدین صورت بود: از کشت سلول‌های رده HK293 (با منشأ کلیه انسان - تهیه شده از مؤسسه پاستور) به دو گوده از پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شد. (محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم و بدون آنتی بیوتیک) پس از ۲۴ ساعت کشت ۵ µL از لیپوفکتامین به ۱۰۰ µL محیط DMEM بدون آنتی بیوتیک و سرم اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. ۱/۳۵ µg از محلول DNA (۱۰µL) نیز به ۱۰۰µL دیگر از همان محیط اضافه شد. سپس دو محیط با هم مخلوط شده و ۴۰ دقیقه در دمای اتاق ماند تا DNA، به داخل لیپوزوم‌ها وارد شود. سپس ۶۰۰µL محیط کشت DMEM بدون سرم و آنتی بیوتیک به آن اضافه شد. در آخر محیط دو گوده کشت شده برداشته شده و ۴۰۰µL از محیط حاوی DMEM بدون سرم و آنتی بیوتیک و Lipofectmine DNA- به هر گوده کشت اضافه شد. به یک گوده پس از ۵ ساعت و گوده دیگر پس از ۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای 37°c و CO2 5% و 95% رطوبت، ۸۰۰µL از محیط DMEM حاوی ۳۰٪ (×۲) سرم اضافه شد (بدون آنتی بیوتیک) تا میزان سرم حد معمول برسد. در ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن DNA سلول‌ها در زیر میکروسکوب invert با اشعه UV و فیلتر آبی بررسی گردید. مشاهده باز تابش سبز درخشان زیر میکروسکوپ فلورسنت (NIKON (ECLIPSE E600 و با استفاده از فیلتر آبی (طول موج nm) در سلول‌های کشت شده در هر دو گوده نشان دهنده کارایی پلاسمید مزبور بود.

لیبل کردن پلاسمید استخراج شده با رود آمین: جهت لیبل کردن پلاسمید مورد استفاده برای بررسی ترانسفکشن اسپرم با ماده فلورسنت رود آمین، از کیت tetramethyl - Rhodamine - 5 - dutp شرکت Roch استفاده شد. از آن جائی که هم جهت ترانسفکشن اسپرم و هم جهت لیبل کردن پلاسمید، شکل خطی کارایی بیشتری دارد؛ ابتدا پلاسمید استحصال شده توسط آنزیم StuI (EcoR147 شرکت Fermentas)، برش داده شد. با توجه به محل برش آنزیم StuI در پلاسمید EGFP-IRES، در این محل هیچیک از توالی‌های مؤثر در بیان insert یا GFP و همچنین ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک وجود ندارد لذا این برش بر موارد فوق اثر و تداخلی ندارد. پس از هضم آنزیم جهت تأیید هضم، ژل الکتروفورز انجام شد. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (extreme® / Fermantase Pure) پلاسمید برش خورده خالص گردید. کارایی نشاندار کردن نیز بر روی سلول‌های مذکور و با همان روش بررسی شد. باز تابش قرمز درخشان در زیر میکروسکوپ فلورسنت (NIKON- ECLIPSE E600) و با استفاده از طول موج ۵۱۰-۵۸۰nm (فیلتر سبز) نشانه جذب پلاسمید توسط سلول‌های کشت شده بود.

آماده سازی اسپرم انزالی: اسپرم‌های مورد بررسی از سه گوسفند ۳ تا ۴ ساله بارور (S1 تا S3) توسط تحریک الکتریکی (الکتروا جکولاتور) تهیه می‌شد. اسپرم انزالی در لوله‌های از پیش گرم شده ۳۷°C جمع‌آوری شده و در عرض ۱۰-۵ دقیقه به آزمایشگاه ارسال می‌شد. در زمان ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه لوله‌ی حاوی منی در آب ۳۷°C قرار داده می‌شد. پس از رسیدن به آزمایشگاه نمونه‌ها از نظر کیفیت منی مورد ارزیابی قرار می‌گرفت و تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک بررسی می‌شد. نمونه‌هایی که بالای ۹۰٪ اسپرم متحرک داشتند مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

شستشو و انکوباسیون: برای شستشو و انکوباسیون اسپرم از محیط TCM 199 (شرکت Gibco) بدون سرم و آنتی بیوتیک استفاده می‌گردید. پس از بررسی منی گرفته شده، نمونه ۳ بار با ۴ برابر حجم محیط TCM شستشو می‌گردید (۵۰۰ g، ۵ دقیقه) و پس از شستشوی آخر محیط مذکور به رسوب اسپرم اضافه می‌شد. سپس تعلیق اسپرم مجدداً از لحاظ تحرک بررسی و شمارش می‌شد. در نهایت تعداد اسپرم به لوله‌های ۰/۵ mL حاوی محیط TCM و DNA پلاسمید اضافه می‌شد به طوری که حجم نهایی به ۲۵ µL می‌رسید. سپس تعلیق اسپرم در محیط ترانسفکشن در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO2 برای زمان‌های مورد نظر قرار داده می‌شد. گروه‌های کنترل تحت همان شرایط اما بدون افزودن DNA پلاسمید تهیه می‌شدند.

برای بررسی اثر محیط‌های مختلف در آزمایش دوم از سه محیط TCM199 (شرکت Gibco)، DMEM (شرکت Gibco) و PBS (125 mM NaCl, 2mM NaH2PO4, 8mM Na2HPO4, 5mM KCl, 5mM Glucose)، (۲۲) برای شستشو انکوباسیون استفاده شد.

بررسی اسپرم‌ها: پس از مدت زمان لازم برای انکوباسیون اسپرم‌ها ابتدا از لحاظ میزان تحرک کل و تحرک پیش رونده با استفاده از میکروسکوپ Olympuse و با بزرگنمایی ۴۰ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. برای ارزیابی حداقل ۳ شان میکروسکوپی و جمعیت ۱۰۰ اسپرم بررسی می‌شد. برای تعیین صحت ارزیابی تحرک به طور متناوب با ارزیابی انجام شده روش CASA مقایسه می‌شد.

ارزیابی جذب DNA خارجی: برای تعیین درصد، شدت و نحوه جذب DNA خارجی از میکروسکوپ فلورسنت (NIKON (ECLIPSE E600 و با استفاده از طول موج ۵۱۰-۵۸۰nm (فیلتر سبز) و بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده

شد. جذب پلاسمید با مشاهده تابش قرمز درخشان مشخص می‌شد. برای تعیین درصد جذب حداقل ۱۰۰ اسپرم در حداقل ۳ شان میکروسکوپی مورد بررسی قرار می‌گرفت. جهت ارزیابی اسپرم‌ها ۶µL از نمونه توسط یک پیت سمپلر که سر سمپلر آن قبلاً بر روی صفحه گرم ۳۷°C قرار داشت بر روی یک لام که آن نیز با قرار دادن روی صفحه گرم به ۳۷°C رسیده بود قرار داده می‌شود و سپس توسط لامل پوشیده می‌شد. برای ارزیابی شدت جذب نیز بر اساس شدت فلورسنت ایجاد شده جذب به ۴ درجه ۱: بسیار ضعیف (حداقل بازتاب قابل تشخیص)؛ ۲: ضعیف، اما به خوبی قابل تشخیص ۳: قوی، کاملاً درخشان؛ ۴: بسیار قوی، بسیار پر درخشش تقسیم می‌شوند.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶/۰) استفاده شد. اطلاعات به صورت mean±SEM بیان شده‌اند و به روش one way Anova تحلیل شده‌اند. هنگامی که Anova تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد با مقادیر با Post hoc test به صورت جفت جفت مقایسه می‌شدند. برای بررسی اثر انکوباسیون و جذب DNA بر تحرک از روش آماری Paired-samples T-Test استفاده شد. تفاوت‌ها در سطح $p<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌داری محسوب می‌شدند.

در این مطالعه موارد زیر مورد بررسی قرار گرفت:

آزمایش اول: برای بررسی ظرفیت جذب DNA خارجی توسط اسپرم انزالی گوسفند و تأثیر آن بر تحرک آزمایش اول انجام شد تا بدین سئوالات پاسخ داده شود: ۱- اثر زمان انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی (دینامیک) بر روند جذب این DNA یعنی درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را به داخل خود جذب کرده بودند و شدت جذب یعنی میزان نسبی DNA خارجی وارد شده در اسپرم ب- بررسی اثر حضور DNA خارجی و جذب آن بر تحرک کل و پیش رونده اسپرم تا مشخص شود که امکان استفاده از این اسپرم‌ها در لقاح آزمایشگاهی وجود دارد. در این آزمایش از ۳ گوسفند مذکور و ۲ بار از هر گوسفند (۳×۲)، به روش ذکر شده در قبل اسپرم تهیه شده و پس از مراحل آماده سازی، اسپرم‌ها با ۱۰۰ng DNA خارجی در ۲۵µL محیط TCM به ازای ۱×۱۰^{۶} اسپرم برای زمان‌های ۱۵؛ ۳۰؛ ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷°C و ۹۸٪ رطوبت و ۵٪ CO2 انکوبه شدند و سپس اسپرم‌ها طبق روش ذکر شده از نظر میزان و شدت جذب DNA خارجی و تحرک بررسی شدند.

تیمار اسپرم‌های ترانسفکت شده با Dnase: برای بررسی نحوه اتصال DNA خارجی به اسپرم و تعیین آن که این پلاسمید به صورت ساده به غشائ اسپرم متصل شده یا آن که به درون اسپرم جذب شده است، بر نمونه‌های اسپرم تهیه شده به روش فوق بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون با ۱۰۰ng پلاسمید مذکور، تیمار با DNase انجام شد. بدین منظور ۱۰µL از تعلیق اسپرم ۲ بار با ۲۰۰µL PBS شستشو شد (۶۰۰g، ۵ دقیقه). پس از بررسی اثر شستشوی اسپرم‌ها بر DNA جذب شده، ۱µL DNaseI (Invitrogen" Cat. No. 18068-015) و ۱µL بافر مربوطه به ۸µL اسپرم اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷°C، ۲ بار با ۲۰۰µL PBS (۶۰۰g، ۵ دقیقه) شستشو شد و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شده و با گروه کنترل مقایسه شدند (۱۰).

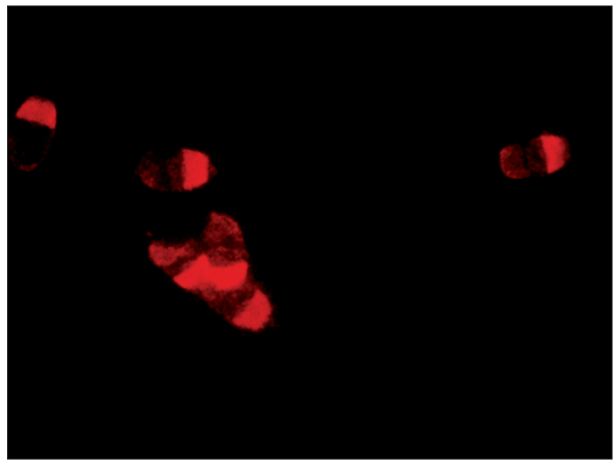
آزمایش دوم: برای بررسی اثر وجود مایع منی (عدم شستشو) در میزان جذب DNA خارجی در مقایسه با اسپرم شسته شده از ۳ گوسفند مذکور و ۲ بار از هر گوسفند (۳×۲)، به روش ذکر شده در قبل اسپرم تهیه شد. اسپرم تهیه شده پس از انتقال به آزمایشگاه دو قسمت می‌شد. یک قسمت طبق روش گفته شده سه بار مورد شستشو قرار می‌گرفت. قسمت دیگر بدون شستشو در محیط TCM رقیق شده و بررسی و شمارش می‌شد. سپس هر دو نمونه با ۱۰۰ng از پلاسمید نشاندار انکوبه می‌شدند. پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه اسپرم‌ها طبق آزمایش قبل از نظر میزان و شدت جذب DNA خارجی و تحرک بررسی شدند.

نتایج

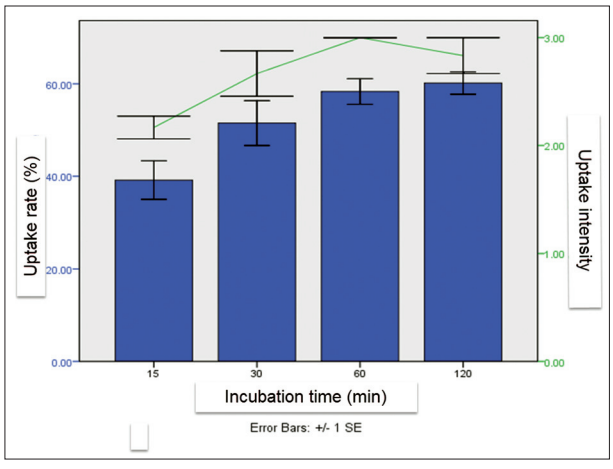
نتایج آزمایش اول (جذب): جذب خود بخود پلاسمید pEGFP-hlys توسط اسپرم‌های گوسفند مشاهده شد. در مشاهده میکروسکوپ فلورسنت دو الگوی تابش فلورسنت وجود داشت. یکی فلورسانس ناحیه آکروزوم به صورت‌های لبه آکروزوم تا تمام ناحیه آکروزوم و دیگر سر تا سر ناحیه پشت آکروزوم (تصویر ۱). درصد اسپرم‌های دارای جذب در ناحیه اکروزوم غالباً در اوائل انکوباسیون زیاد بوده که با افزایش زمان انکوباسیون از شدت و درصد آن کاسته می‌شده است. اسپرم‌هایی که تابش فلورسانس را در ناحیه پشت آکروزوم نشان می‌دادند به عنوان اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی محسوب می‌شدند.

درصد و شدت جذب: درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند (درصد جذب) و شدت جذب پس از ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون با ۱۰۰ng DNA خارجی در جدول ۱ آمده است. با وجود آن که درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند با افزایش زمان افزایش نشان می‌دهد اما تنها تا ۳۰ دقیقه انکوباسیون افزایش معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p<0/05$). به عبارت دیگر افزایش زمان انکوباسیون بیش از ۳۰ دقیقه باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی نمی‌شد. همچنین با وجود مشاهده افزایش جزیی در میانگین شدت جذب DNA خارجی با افزایش زمان انکوباسیون، اما این افزایش تنها تا ۳۰ دقیقه معنی‌دار بود و بیش از آن باعث افزایش معنی‌دار نمی شد ($p<0/05$) (تصویر ۲).

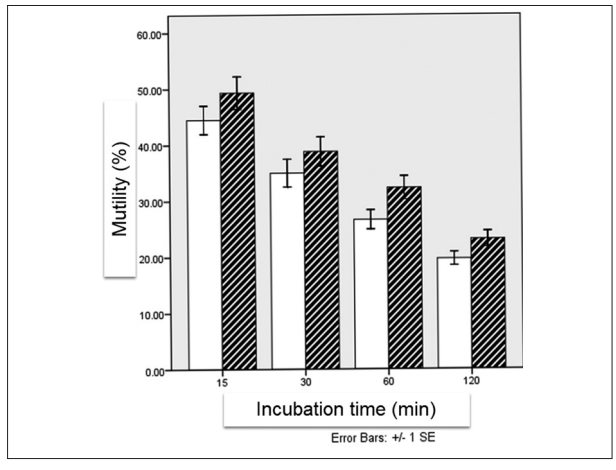
تحرک و تحرک پیش رونده: میزان تحرک کل و پیش رونده اسپرم‌هایی که در زمان‌های مختلف با DNA خارجی انکوبه شده بودند در مقایسه با اسپرم‌های گروه شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است. محاسبه آماری (آزمون T زوجی) نشان می‌دهد که به جز تحرک کل در ۱۵ دقیقه انکوباسیون اختلاف تحرک کل و پیش رونده اسپرم‌های انکوبه شده با

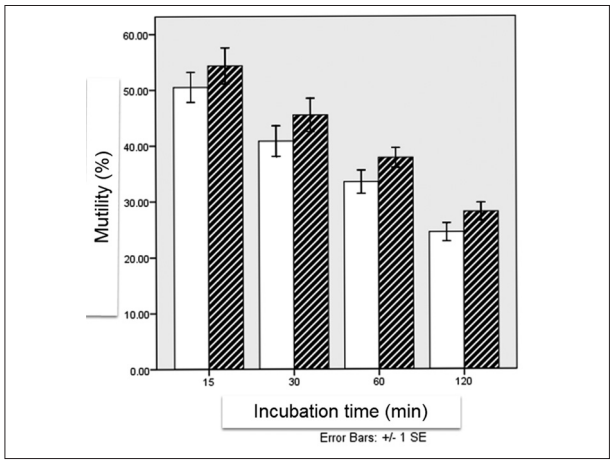


تصویر۱. فلورسانس حاصل از پلاسمید نشان دار در ناحیه آکروزوم و پشت آکروزوم. جذب در ناحیه پشت آکروزوم جذب واقعی دانسته می‌شود.



تصویر ۲. درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی (ستون) و شدت جذب (خط) پس از ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون با ۱۰۰ ng DNA خارجی.





تصویر ۳. تحرک کل (چپ) و پیش رونده (راست) اسپرم‌های انکوبه شده با DNA خارجی در زمان‌های مختلف. ☐ Treated Spermatozoa ▨ Control Spermatozoa

DNA خارجی و اسپرم‌های گروه شاهد در سایر موارد معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵) (تصویر ۳).

اثر تیمار DNase: پس از شستشوی اولیه با PBS شدت فلورسنت کمی کمتر از نمونه‌های کنترل (تیمارنشده با DNase) بود. و تجمع DNA در ناحیه آکروزوم به خاطر تخلیه آکروزوم در بیشتر اسپرم‌ها دیده نمی‌شد و در صورت حضور نیز میزان آن بسیار کاهش یافته بود. اما میزان بازتاب فلورسنت از ناحیه پست آکروزوم کاهش چندانی نیافته بود. پس از تیمار با DNase در اسپرم‌های حاوی DNA خارجی در ناحیه پشت آکروزوم گرچه شدت جذب (شدت بازتاب فلورسنت) در ناحیه پست آکروزوم کمی کاهش نسبت به گروه کنترل نشان می‌داد اما هنوز کاملاً درخشان بود.

آزمایش دوم: نتایج به دست آمده از بررسی اثر وجود مایع منی (عدم شستشو) در درصد جذب، شدت جذب DNA خارجی و تحرک تام در مقایسه با اسپرم شسته نشده در جدول ۳ آمده است. طبق این نتایج حضور مایع منی در هر دو زمان انکوباسیون ۳۰ و ۶۰ دقیقه باعث کاهش معنی‌دار در درصد جذب و شدت جذب DNA خارجی و افزایش تحرک تام اسپرم‌ها شد (p<۰/۰۵) (آزمون T زوجی).

بحث

در این مطالعه جذب DNA خارجی در اسپرم انزالی گوسفند بررسی شد و نشان داده شد که اسپرم انزالی گوسفند قابلیت جذب خود بخود DNA خارجی را دارد. DNA خارجی نشان دار شده با ماده فلورسنت رودامین در ناحیه آکروزوم بخصوص قسمت قدامی آن و ناحیه پشت آکروزوم اسپرم جا گرفته بود گرچه به نظر میرسد جذب واقعی DNA خارجی تنها به ناحیه پشت آکروزوم محدود می‌شود. این یافته همخوان با دیگر مطالعات است (۲،۳،۶،۲۳،۴۱،۴۴،۴۵).

بعضی گزارشات نشان می‌دهند که مولکول DNA غالباً روی غشاء اسپرم متصل می‌شود و به داخل اسپرم نمی رود(۹،۳۱) اما بعضی دیگر از محققین نشان داده اند که DNA می تواند به داخل هسته اسپرم نفوذ کند و حتی ممکن است به داخل ژنوم اسپرم وارد شود (۱۵،۴۶). در این مطالعه نتایج شستشو و تیمار اسپرم متصل شده به DNA خارجی با DNase نشان

جدول ۱. درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی را جذب کرده‌اند و شدت جذب پس از ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون با ۱۰۰ng DNA خارجی.

	زمان انکوباسیون (دقیقه)	Mean	Std. Error
درصد جذب DNA خارجی	۱۵	۳۹/۱۶	۴/۱۶
	۳۰	۵۱/۵۰	۴/۸۴
	۶۰	۵۸/۳۳	۲/۷۶
	۱۲۰	۶۰/۱۶	۲/۴۲
	کل	۵۲/۲۹	۲/۴۳
شدت جذب DNA خارجی	۱۵	۲/۱۶	۰/۱۰
	۳۰	۲/۶۶	۰/۲۱
	۶۰	۳/۰۰	۰/۰۰
	۱۲۰	۲/۸۳	۰/۱۶
	کل	۲/۶۲	۰/۰۹

جدول ۲. تحرک کل و پیش رونده اسپرم‌های انکوبه شده با ۱۰۰ng DNA خارجی در مقایسه با اسپرم‌های گروه شاهد پس از ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون.

	تحرک اسپرم تیمار شده با DNA		تحرک شاهد	
زمان انکوباسیون	کل	پیش رونده	کل	پیش رونده
۱۵	۵۰/۵۰±۲/۶۹	۴۴/۵۰±۲/۵۲	۵۴/۳۳±۳/۲۲	۴۹/۳۳±۲/۹۰
۳۰	۴۰/۸۳±۲/۷۴	۳۵/۰۰±۲/۴۷	۴۵/۵۰±۲/۹۹	۴۱/۴۵±۲/۳۲
۶۰	۳۳/۵۰±۲/۰۹	۲۶/۶۶±۱/۷۲	۳۷/۸۳±۱/۷۷	۳۲/۳۳±۲/۰۹
۱۲۰	۲۴/۵۰±۱/۶۰	۱۹/۶۶±۱/۲۰	۲۸/۱۶±۱/۶۰	۲۳/۱۶±۱/۴۲

داد که DNA جذب شده به داخل اسپرم در ناحیه پشت آکروزوم وارد شده است و تنها به سطح غشاء نچسبیده است گرچه DNA خارجی متصل شده به ناحیه آکروزوم به میزان زیادی پس از شستشو و اثر DNase جدا شده و از بین رفته است. البته در این بررسی بازتاب فلورسنت به طور مشخص از هسته چه قبل وچه بعد از تیمار با DNase مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل حضور مقدار بسیار کم پلاسمید در هسته نسبت به غشاء وسیتوپلاسم باشد، به طوری که در یک بررسی میزان اتصال پلاسمید حاوی ژن لیزوزیم انسانی (pFLAG-hLY) به غشاء اسپرم بز ۱۸۶۰۰۰ نسخه و میزان پلاسمید داخل شده به هسته به طور متوسط ۷۸ نسخه به هر اسپرم بود(۲۴). گرچه بعضی یافته‌ها نشان داده است که حدود ۱۵ تا ۲۲٪ از DNA متصل شده به اسپرم به هسته اسپرم وارد می‌شود (۱۲). البته مکانیسم اتصال و دخول DNA خارجی به اسپرم سوالی است که هنوز به درستی جواب داده نشده و نیاز به بررسی بیشتر است.

Eghbalsaied و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تیمار اسپرم گاو با DMSO (۱،۰ و ۳٪) و لیپوفکتامین (۳ µL و ۱) و انکوباسیون این اسپرم‌ها با پلاسمید خطی شده حاوی ژن GFP و لیبل شده با رودآمین یا Cy3 مشاهده کردند که DNA خارجی تنها به سطح اسپرم متصل شده بود و به اسپرم داخل نشده بود. اما با اثر دادن DNase به این اسپرم‌ها، DNAهای متصل به اسپرم تجزیه نشدند و با PCR قابل شناسایی بودند (۱۱). Cho با آنالیز LSC (liquid scintillation counting) نشان داد که اسپرم انکوبه شده با کمپلکس DNA / لیپوزوم، DNA خارجی متصل شده به اسپرم با تیمار با DNase1 تجزیه شده و به شدت کاهش می‌یابد (۱۰). در این آزمایش با انجام PCR مشخص شد که DNA خارجی تنها به صورت سازه‌ای به غشاء اسپرم متصل شده و داخل نرفته است. همچنین نشان داده اند تیمار اسپرم انکوبه شده با DNA خارجی با DNase I از بیان eGFP در رویان‌های ایجاد شده به روش ICSI با این اسپرم‌ها جلوگیری می‌کند (۴۲).

اتصال DNA خارجی به اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت و بین ۰/۳٪ تا ۷۸٪ گزارش شده است گرچه به علت تفاوت روش‌های ترانسفکشن و سنجش نمی‌توان یک مقایسه مستقیم بین گزارشات مختلف انجام داد. میزان جذب با سنجش به روش نشان دار کردن DNA خارجی و بررسی با میکروسکوپ نوری در گاو، خوک و موش ۳۹-۷۸٪ گزارش شده است (۴،۶،۱۲،۱۶،۲۲). گزارش مشخصی در این مورد در گوسفند منتشر نشده است اما در یک تحقیق در بز درصد اسپرم‌هایی که DNA خارجی به آنها وارد شده (اسپرم‌هایی که پس از شستشو و تیمار با Dnase هنوز مثبت بودند) حدود ۴/۸۳ تا ۷۰/۰۰٪ بود(۴۵). در بررسی حاضر تا ۶۸٪ اسپرم‌ها پلاسمید pEGFP-hlys را جذب کرده بودند (متوسط ۶۰/۱۶٪).

زمان انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی می‌تواند در میزان جذب آن مؤثر باشد لذا بهینه کردن زمان انکوباسیون مهم است. به‌دست آوردن بیشترین میزان اسپرم دریافت کرده DNA خارجی بدون بار شدن بیش از حد آن مهم است زیرا بار شدن بیش از حد DNA خارجی می‌تواند هم برای لقاح مضر باشد و هم باعث فعال شدن آندونوکلئازهای اسپرم گردد. اگرچه افزایش زمان انکوباسیون باعث افزایش میزان جذب می‌شود اما اعتقاد بر این است که این امر یعنی جذب بیش از حد باعث شروع روند فعالیت آندونوکلئازهای اسپرم می‌شود(۲۶) که احتمالاً باعث تجزیه هم DNA آندوژن و هم اگزوژن و کاهش میزان باروری می‌شود(۴۰). در آزمایش حاضر با انکوباسیون اسپرم انزالی شسته شده گوسفند با ng۱۰۰ از پلاسمید pEGFP-hlys با افزایش زمان انکوباسیون تا ۳۰ دقیقه افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی و شدت جذب آن مشاهده شد. اگر چه حد اکثر میزان اسپرم‌های حاوی DNA خارجی در ۱۲۰ دقیقه و حدود ۶۰٪ بود اما این افزایش در بیش از ۳۰ دقیقه انکوباسیون معنی‌دار نبود. بیشترین سرعت (میزان) جذب یعنی حدود ۶۵٪ جذب کل در ۱۵ دقیقه اول انکوباسیون بوده است و ۸۵٪ جذب کل در عرض ۳۰ دقیقه رخ داده بود و تا ۶۰ دقیقه به تدریج از سرعت جذب کاسته شده است که با یافته‌های به دست آمده در خوک(۲۲) همخوانی داشت. همچنین تنها تا ۳۰ دقیقه انکوباسیون باعث افزایش معنی‌دار شدت جذب DNA خارجی در اسپرم‌ها می‌شد. لذا به نظر می‌رسد انکوباسیون اسپرم با DNA خارجی بیش از ۳۰ دقیقه لازم نباشد.

میزان و زمان جذب DNA ممکن است نه تنها تفاوت گونه‌ای بلکه تفاوت فردی نیز داشته باشد. مشاهده شده است که میزان جذب DNA توسط اسپرم در خوک‌های مختلف به شدت متفاوت بوده است اما کینتیک جذب در همه نمونه‌ها یکسان بوده است(۲۱). در گاو و بز نیز این امر نشان داده شده است(۷،۴۵). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که

جدول ۳. اثر وجود مایع منی در میزان جذب، شدت جذب و تحرک تام.

زمان انکوباسیون (دقیقه)	میزان جذب (SE±٪)		شدت جذب (SE±٪)		تحرک تام (SE±٪)	
	اسپرم شسته شده	اسپرم شسته نشده	اسپرم شسته شده	اسپرم شسته نشده	اسپرم شسته شده	اسپرم شسته نشده
۳۰	۵۰/۱۶± ۱/۹۵	۳۲/۸۳± ۳/۴۲	۳/۰۸± ۰/۰۸	۲/۰۰± ۰/۲۸	۳۰/۶۶± ۵/۱۹	۳۷/۸۳± ۶/۵۸
۶۰	۵۹/۰۰± ۳/۰۰	۳۶/۳۳± ۳/۸۱	۳/۱۶± ۰/۱۰	۲/۲۵± ۰/۳۸	۲۴/۳۳± ۵/۶۵	۲۹/۶۴±۷/۱۰

می تواند تفاوت‌های فردی هم در درصد اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی و هم شدت جذب وجود داشته باشد. به نظر می‌رسد در منی تحت گروه‌های متفاوتی از اسپرم وجود داشته باشد که دارای ظرفیت‌های متفاوتی برای پذیرش ژن خارجی باشند(۳۶). لذا به علت تفاوت‌های فردی در جذب DNA دستورالعمل کار باید برای هر فرد حیوان، به طور مجزا بهینه شود.

تحرک: تحرک خصوصیتی از اسپرم است که برای عملکرد بیولوژیک اسپرم ضروری است لذا تعیین اثر انکوباسیون به DNA خارجی بر تحرک بسیار با اهمیت است. با گذشت بیش از ۲۰ سال از تحقیقات انجام شده در زمینه SMGT هنوز اثر این تکنیک بر تحرک اسپرم به طور واضحی معین نشده است و نتایج به دست آمده از گروه‌های مختلف بسیار متفاوت و متناقض است. وجود اثر منفی شدید جذب DNA خارجی بر تحرک می تواند منتج به عدم امکان استفاده از آن در روش هایی مثل IVF یا تلقیح مصنوعی باشد. موضوعی که عدم موفقیت بسیاری از گروه‌ها در به‌دست آوردن جنین یا نوزاد ترانسژنیک با روش SMGT می تواند ناشی از آن باشد (۷). در مصالعه حاضر گرچه به جز تحرک کل در ۱۵ دقیقه انکوباسیون اختلاف معنی‌دار در تحرک کل وپیش رونده اسپرم‌های انکوبه شده با DNA خارجی و اسپرم‌های گروه شاهد مشاهده شده است اما این اختلاف به هیچ وجه برابر درصد اسپرم‌های حاوی DNA خارجی نبود؛ مثلاً پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون تعداد اسپرم‌هایی که داری جذب DNA خارجی بوده اند حدود ۵۸٪ بود اما اختلاف تحرک این اسپرم‌ها با گروه شاهد تنها حدود ۴٪ بوده است. لذا به نظر نمی رسد جذب DNA خارجی عامل اصلی در این اختلاف بوده است. در حالیکه بعضی از مطالعات کاهش تحرک اسپرم به دنبال انکوباسیون با DNA خارجی را نشان داده است(۲،۱۴،۳۳) اما در بعضی مطالعات دیگر این کاهش تحرک دیده نشد(۱،۳۲). بعضی از محققین نیز این کاهش را ناشی از مراحل شستشو یا حذف مایع منی می دانند(۱۸). اما Bacci و همکاران این یافته را تأیید نمی‌کنند به طوری که حذف مایع منی در خوک اثر منفی بر پارامترهای تحرک اسپرم و یا پتانسیل غشاء میتوکندری اسپرم و قابلیت حیات نداشت(۴).

یک یافته مهم در این مطالعه آن بود که گرچه در صد بالایی از اسپرم‌هایی که در ناحیه آکروزوم داری جذب DNA خارجی بودند متحرک بودند اما هیچ اسپرم متحرکی که دارای جذب در ناحیه پشت آکروزوم باشد دیده نشد. این یافته با تحقیقات Shadanloo و anzar (در گاو) هم خوانی دارد (۲،۳۴).

پلاسمای منی: به نظر می رسد پلاسمایی منی نقش مهمی به عنوان یک سد طبیعی برای اسپرم در برابر DNA خارجی عمل می‌کند. نشان داده شده است که مایع سمینال از جذب ممانعت می‌کند (۴۵). جذب DNA توسط اسپرم انزالی (درخوک) تنها پس از شستشوی کامل و حذف کامل مایع منی به گزارش شده است. اضافه کردن مایع سمینال به اسپرم شسته شده نیز اثر ممانعتی از جذب DNA داشت و در اسپرم شسته نشده هیچ اتصال DNA رخ نداده است(۲۲). لذا بعضی گزاشات نشان می دهد که تنها اسپرم اپی دیدیمی و اسپرم انزالی که با شستشوهای مکرر مقادیر اندک مایع سمینال حذف شده باشد قادر به جذب DNA خارجی هستند (۶،۴۴). بنابراین اسپرم اپیدیمی یک مدل خوب برای بررسی اثرات اجزاء پلاسمای منی است. یک فاکتور ممانعت کننده قوی از اتصال DNA به نام IFI هم در مایع منی پستانداران و هم در سطح اسپرم گونه‌های ساده تر که مایع سمینال ندارند (متل توتیا) یافت شده است. IF1 یک گلیکوپروتئین است که تأثیر آن مربوط به جز پلی ساکاریدی آن است و با N ۰/۱ گلیکوزیداز یا O گلیکوزیداز کاملاً بی اثر می شود(۴۴) این عامل در بین گونه‌های مختلف اثر متقابل دارد. IFI به طور انتخابی به ناحیه پشت آکروزوم اسپرم متصل می شود. یعنی همان جزیی از سلول که برای اتصال DNA مورد هدف قرار می‌گیرد. بنابراین IFI احتمالاً نقش مهمی را در طبیعت به عنوان یک سپر برای محافظت اسپرماتوزوای اپیدیمی (سلول‌های بسیار فعال) از جذب مولکول‌های خارجی که می توانند به یکپارچگی و تمامیت ژنتیکی اسپرم آسیب بزند دارد. با این حال در بعضی گزارشات وجود مایع سمینال گرچه به طور معنی داری ظرفیت جذب DNA خارجی را کاهش داده است اما به طور کامل از جذب جلوگیری نکرده است(۴۵). همچنین با اثر Dnase I برای بررسی میزان اتصال (قبل از تأثیر آنزیم) و ورود (بعد از تأثیر آنزیم) DNA نشان دار شده با دیگوکسی ژنین (DIG) به اسپرم بزمشاهده شد که این میزان در اسپرم شسته شده به ترتیب ۳ و ۵ برابر بیش از اسپرم شسته نشده است(۴۳). در مطالعه حاضر نیز عدم شستشوی منی اگر چه باعث جلوگیری کامل از جذب DNA خارجی نشد اما درصد اسپرم‌های دارای جذب DNA خارجی را به طور متوسط ۱۷ تا ۲۷٪ (به ترتیب پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه انکوباسیون) کاهش داد. همچنین شدت جذب یعنی میزان DNA خارجی در هر اسپرم نیز به طور معنی داری کمتر بود.

اسپرم انزالی گوسفند می تواند به میزان بالایی پلاسمید حاوی ژن

لیزوزیم انسانی را به خود جذب کند. اگرچه این جذب باعث کاهش کمی در تحرک تام و پیش رونده اسپرم‌ها می‌شود اما با ۱۵ تا ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون در حضور ng۱۰۰ از این پلاسمید هیچ کدام از اسپرم‌های حاوی DNA خارجی متحرک نبودند. لذا انکوباسیون با مقادیر کمتر DNA خارجی و زمان‌های کمتر ممکن است بتوان اسپرم‌های متحرک حاوی DNA خارجی به دست آورد.

تشکر و قدردانی

از بخش پزشکی مولکولی مؤسسه پاستور به خاطر در اختیار گذاردن بعضی از امکانات مورد نیاز این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Alderson, J., Wilson, B., Laible, G., Pfeffer, P., L'Huillier, P. (2006) Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis. Anim Reprod Sci. 91: 23-30.
2. Anzar, M., Buhr, M. (2006) Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. Theriogenology. 65: 683-690.
3. Atkinson, P.W. Fau - Hines, E.R., Hines Er Fau - Beaton, S., Beaton, S., Fau - Matthaei, K.I., Matthaei Ki Fau - Reed, K.C., Reed Kc Fau - Bradley, M.P., Bradley, M.P. (1991) Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. Mol Reprod Dev. 29: 1-5.
4. Bacci, M.L., Zannoni, A., De Cecco, M., Fantinati, P., Bernardini, C., Galeati, G., Spinaci, M., Giovannoni, R., Lavitrano, M., Seren, E., Forni, M. (2009) Sperm-mediated gene transfer-treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine. Theriogenology. 72: 1163-1170.
5. Brackett, B.G., Baranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H. (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. Proc Natl Acad Sci. 68: 353-357.
6. Camaioni, A., Russo, M., Odorisio, T., Gandolfi, F., Fazio, V., Siracusa, G. (1992) Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. Reproduction. 96: 203.
7. Canovas, S., Gutierrez-Adan, A., Gadea, J. (2010) Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. Mol Reprod Dev. 77: 687-698.
8. Castro, F.O., Hernandez, O., Uliver, C., Solano, R., Milanes, C., Aguilar, A., Perez, A., de Armas, R., Herrera, L., de la Fuente, J. (1990) Introduction of foreign DNA intro the spermatozoa of farm animals. Theriogenology. 34: 1099-1110.
9. Chan, A.W., Luetjens, C.M., Schatten, G.P. (2000) Sperm-mediated gene transfer. Curr Top Dev Biol. 50: 89-102.
10. Cho, H.Y., Chung, K.H., Kim, J.H. (2002) Follow-up of exogenous DNA by sperm-mediated gene transfer via liposome. Asian-Autrala Assoc Anim Prod Soc. 15: 1412-1421.
11. Eghbalsaied, S., Nasr-esfahani, M.H., Ghaedi, K., Mozafari, N. (2008) Lipofectamine Does Not Enhance Bovine Sperm Transfection Efficiency, Yakhteh Med J. 10, supplement. 1: 10.
12. Francolini, M., Lavitrano, M., Lamia, C.L., French, D., Frati, L., Cotelli, F., Spadafora, C. (1993) Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. Mol Reprod Dev. 34: 133-139.
13. Gagné, M.B., Pothier, F., Sirard, M.-A. (1991) Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. Mol Reprod Dev. 29: 6-15.
14. Gandolfi, F. (2000) Sperm-mediated transgenesis. Theriogenology. 53: 127-137.
15. Gandolfi, F., Terqui, M., Modina, S., Brevini, T., Ajmone-Marsan, P., Foulon-Gauze, F., Courot, M. (1996) Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA-treated sperm. Reprod Fertil Dev. 8: 1055-1060.
16. García-Vázquez, F., Gutiérrez-Adán, A., Gadea, J. (2009) Evaluation of binding sperm-exogenous DNA in ejaculate and epididimary porcine spermatozoa. Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides porcinos eyaculados y

epididimarios. 41: 131-138.

17. Hoelker, M., Mekchay, S., Schneider, H., Bracket, B.G., Tesfaye, D., Jennen, D., Tholen, E., Gilles, M., Rings, F., Griese, J., Schellander, K. (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: 1097-1107.
18. Kang, J.H., Hakimov, H., Ruiz, A., Friendship, R.M., Buhr, M., Golovan, S.P. (2008) The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. Theriogenology. 70: 1288-1296.
19. Khoo, H.W., Ang, L.H., Lim, H.B., Wong, K.Y. (1992) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture. 107: 1-19.
20. Lauria, A., Gandolfi, F. (1993) Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. Mol Reprod Dev 36: 255-257.
21. Lavitrano, M., Bacci, M.L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., Fioretti, D., Giancotti, P., Marfe, G., Pucci, L., Renzi, L., Wang, H., Stoppacciaro, A., Stassi, G., Sargiacomo, M., Sinibaldi, P., Turchi, V., Giovannoni, R., Della Casa, G., Seren, E., Rossi, G. (2002) Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 14230-14235.
22. Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M.L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H., Seren, E. (2003) Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. Mol Reprod Dev. 64: 284-291.
23. Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., Spadafora, C. (1992) The interaction between exogenous DNA and sperm cells. Mol Reprod Dev. 31: 161-169.
24. Ma, H., Quan, F., Chen, D., Zhang, B., Zhang, Y. (2010) Alterations in mitochondrial function and spermatozoal motility in goat spermatozoa following incubation with a human lysozyme plasmid. Anim Reprod Sci. 121: 106-114.
25. Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C., Kiessling, A.A. (1998) Sperm-mediated gene transfer in mice. Mol Reprod Dev. 50: 406-409.
26. Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R., Spadafora, C. (1997) Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. DNA Cell Biol. 16: 1087-1097.
27. Muller, F., Ivics, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvath, L., Maclean, N. (1992) Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. Mol Mar Biol Biotechnol. l 1: 276-281.
28. Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín, R., Olivera, R., Jarazo, J., Vichera, G., Gibbons, A., Salamone, D. (2008) A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. Reprod Fertil Dev. 20: 741-749.
29. Pereyra-Bonnet, F., Gibbons, A., Cueto, M., Sipowicz, P., Fernandez-Martin, R., Salamone, D. (2011) Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the Ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization and ICSI. J Reprod Dev. 57: 188-196.
30. Perez, A., Solano, R., Castro, F.O., Lleonart, R., de Armas, R., Martinez, R., Aguilar, A., Herrera, L., de la Fuente, J. (1991) Sperm cells mediated gene transfer in cattle. Biotechnol Appl. 8: 90-94.
31. Perry, A.C.F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. (1999) Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. Science. 284: 1180-1183.
32. Rieth, A., Pothier, F., Sirard, M.A. (2000) Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. Mol Reprod Dev. 57: 338-345.
33. Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F., Brem, G. (1995) Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. Anim Biotechnol. 6: 41-50.
34. Shadanloo, F., Najafi, M.H., Hosseini, S.M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Ghaedi, K., Abedi, P., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., Eskandari-Nasab, M.P., Esfahani, M.H.N. (2010) Sperm status and

DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. Mol Reprod Dev. 77: 868-875.

35. Shemesh, M., Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Benvenisti, L., Shore, L.S., Stram, Y. (2000) Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. Mol Reprod Dev. 56: 306-308.
36. Shim, S., Kim, Y., Lee, H., Shim, H. (2008) Effects of sperm membrane disruption and electrical activation of oocytes on in vitro development and transgenesis of porcine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. intracytoplasmic sperm injection. Asian-Aust. J Anim Sci. 21: 358- 363.
37. Smith, K., Spadafora, C. (2005) Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. Bioessays. 27: 551-562.
38. Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M.L., Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., Lavitrano, M. (1996) Sperm?mediated DNA transfer in bovine and swine species. Anim Biotechnol. 7: 59-77.
39. Squires, E., Dark, D. (1993) Liposome -mediated DNA transfer to chiken sperm cells. Anim Biotecnol. 4: 71-88.
40. Tanghe, S., Van Soom, A., Sterckx, V., Maes, D., De Kruif, A. (2002) Assessment of Different Sperm Quality Parameters to Predict in vitro Fertility of Bulls. Reprod Domest Anim. 37: 127-132.
41. Wang, H.J., Lin, A.X., Chen, Y.F. (2003) Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. Anim Biotechnol. 14: 155-165.
42. Wu, Y., Liu, C.J., Wan, P.C., Hao, Z.D., Zeng, S.M. (2009) Factors affecting the efficiency of producing porcine embryos expressing enhanced green fluorescence protein by ICSI-mediated gene transfer method. Anim Reprod Sci. 113: 156-166.
43. Ye, H.H., Liu, Y., Liu, Z.G., Song, W.P., Lu, J.S., Zhou, Y.R., Sheng, J.P., Deng, J.X. (2006) Characteristics and Influencing factors of Sperm Interaction with Exogenous DNA. Yi Chuan. 28: 659-664.
44. Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S., Spadafora, C. (1995) The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. Exp Cell Res. 217: 57-64.
45. Zhao, Y., Yu, M., Wang, L., Li, Y., Fan, J., Yang, Q., Jin, Y. (2012) Spontaneous uptake of exogenous DNA by goat spermatozoa and selection of donor bucks for sperm-mediated gene transfer. Mol Biol Rep. 39: 2659-2664.
46. Zoraqi, G., Spadafora, C. (1997) Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. DNA Cell Biol. 16: 291-300.

Transfection of ram spermatozoa with pEGFP carrying human lysozyme gene

Hoseini Pajooh, K.[1*], Tajik, P.[2], Karimipoor, M.[3], Behdani, M.[3], Davoodi, M.[4]

[1]*Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran-Iran*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran-Iran.*

[4]*Graduated From the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 20 May 2014, Accepted 15 July 2014)

Abstract:

BACKGROUND: As we all know, sperm has the capacity to take up foreign DNA, therefore, sperm mediated gen transfer can be an inexpensive and simple method in animal transgenesis in various species. However, there is not sufficient evidence of DNA uptake by ovine spermatozoa. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to examine the uptake of human lysozyme gene contained plasmid (pEGFP-IRES-hLys) by ovin spermatozoa. **METHODS:** In the first experiment, semen was prepared from three ram (each ram two times) by electrical method. After removal of seminal plasma, 1x106 spermatozoa were incubated with rhodamin-labled pEGFP-IRES-hLys in TCM199 for 15, 30, 60 and 120 minutes and then observed for motility, uptake percent and uptake intensity by florescent microscopy. Also after 60 minutes incubation sperms were treated by DNaseI to assay adsorption or uptake of pEGFP-IRES-hLys. In the second experiment, washed and unwashed sperms were incubated with rhodamin-labled pEGFP-IRES-hLys in TCM199 for 30 and 60 minutes to evaluate the effect of presence seminal plasma on sperm uptake and motility. **RESULTS:** The findings showed that increasing incubation time increased number/percentage of spermatozoa carrying exogenous DNA and its intensity. But this different was significant only up to 30 minutes. We found that 60.16% of the cells were bound to DNA after 120 minutes incubation. Incubation with exogenous DNA induced a slightly decrease in sperm total and progressive motility. But no post acrosom uptaked sperm was motile. After treatment with DNaseI, strong florescent emission from post acrosom indicated absorption of pEGFP-IRES-hLys by spermatozoa. Presence of seminal plasma induced a slightly decrease in percent of DNA absorbed spermatozoa and absorption intensity, but did not inhibit completely. **CONCLUSIONS:** Ram spermatozoa showed a high capacity to bind DNA quickly and reach a maximum after 30 min. However, no sperm with real uptake (post acrosomal) was motile. Incubation with lower DNA concentration and/or shorter time may be helpful.

Key words: human lysozyme, ram, SMGT

Figure Legends and Table Captions

Figur 1. Fluorescence emission in post acrosome and acrosome. post acrosomal uptake is actual absorption.

Figur 2. Uptake rate (bar) and uptake intensity (line) of labeled plasmid in spermatozoa incubated with 100 ng plasmid for 15, 30, 60 and 120 min.

Figur 3. Total (right) and progressive (left) motility in spermatozoa incubated with 100 ng plasmid for 15, 30, 60 and 120 min.

Table 1. Uptake rate and uptake intensity of labeled plasmid in spermatozoa incubated with 100 ng plasmid for 15,30,60 and 120 min.

Table 2. Total and progressive motility in spermatozoa incubated with 100 ng plasmid for 15, 30, 60 and 120 min.

Table 3. Effect of seminal fluid existence on uptake rate, uptake intensity and total motility.

***Corresponding author's email: pajooh@irost.ir, Tel: 021-556276613, Fax: 021-556275510**