

انتقال ژن EGFP به کلونی اسپرماتوگونی گوساله به روش لیپوفکسیون

زهرا فضل الهی^۱ پرویز تاجیک^{۱*} خسرو حسینی پژوه^۲ گلشید جاودانی شاهدین^۱^(۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران^(۲) گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۳۰ دی ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: در بالغین، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) تنها سلول‌های بنیادی هستند که قادر به انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد می‌باشند. با در نظر گرفتن این که یک SSC منفرد می‌تواند به تعداد زیادی از اسپرماتوزوآ تبدیل شود، دستکاری ژنتیکی این سلول‌ها یک تکنولوژی نوین با کاربردهای عملی در گونه‌های مختلف حیوانی را مهیا می‌سازد. هدف: در این مطالعه ارزیابی انتقال ژن Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) به کلونی‌های اسپرماتوگونی گاوی از طریق حامل لیپوزومی و بهترین روز انکوباسیون در جذب ژن توسط کلونی‌های اسپرماتوگونی بررسی شد. روش کار: کارایی انتقال ژن خارجی EGFP به SSCs از طریق Lipofection در سه روز از شروع کشت کلونی‌های اسپرماتوگونی (روز ۴، ۸ و ۱۲) توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. توسط رنگ آمیزی ایمونوسیتوفلورسنت علیه مارکرهای OCT4 و Vimentin، ماهیت SSCs و سلول‌های سرتولی تأیید شد. نتایج: نتایج نشان داد که کلونی‌های ترانسفکت شده از طریق lipofection در هر سه روز انجام ترانسفکشن در مقایسه با گروه‌های شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). کلونی‌های ترانسفکت شده در مقایسه با گروه‌های بدون حامل ژن خارجی نیز بالاتر بود (معنی‌دار) نرخ آلوده سازی کلونی زمانی که ترانسفکشن در روز ۴ کشت انجام شد بود بیشتر بود. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که لیپوفکتامین می‌تواند به منظور انتقال مستقیم DNA خارجی به کلونی اسپرماتوگونی به ویژه در روز ۴ کشت به صورت ایمن به کار رود.

واژه‌های کلیدی: ترانسفکشن، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، Lipofectamine

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پایه و اساس تولید مداوم اسپرماتوزوآ در بزرگسالی هستند. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه بسیار کم است (تقریباً ۱ سلول در ۳۰۰۰ سلول) و دو وظیفه مهم بر عهده دارند: (۱) تمایز و تولید نسل‌های پیشرفته تر سلول‌های زایا که اسپرماتوزوآ را تکمیل می‌کنند و باروری را حفظ می‌کنند. (۲) خودنوسازی به منظور حفظ ذخایر سلولی (۲۲) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند زیرا تنها سلول‌های بنیادی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند. بنابراین دستکاری رده سولی زایای جنس نر از طریق دستکاری این سلول‌ها امکان پذیر می‌شود. این قابلیت به ما امکان دستکاری و تغییر فنوتیپ نتاج از جمله تصحیح جهش‌هایی که باعث بیماری‌هایی همچون اوتیسم، دیابت، سندرم داون و بیماری قلبی را می‌شود فراهم می‌سازد. هم چنین این سلول‌ها مستقیماً در باروری سهمیم هستند. اختلال در مسیر این سلول‌ها بر روند اسپرماتوزوآز تأثیر منفی دارد و سبب کاهش باروری و ناباروری می‌شود (۱۲، ۷، ۳).

ترازیخت کردن شامل انتقال یک توالی DNA خارجی به داخل ژنوم یک موجود خاص است که پس از آن در بیشتر سلول‌های آن موجود وجود داشته باشد و به نسل بعد منتقل شود. موجود ترازیخته ممکن است با اهداف درمانی تولیدی و یا تحقیقاتی ایجاد شود. هدف از تولید یک حیوان ترازیخته ممکن است تولید یک پروتئین جدید در آن موجود، افزایش تولید یک

پروتئین از قبل موجود، و یا سرکوب یک ژن داخلی و جلوگیری از تولید یک پروتئین باشد (۱۶).

انواع روش‌های انتقال ژن به سلول‌های زایا شامل روش‌های ویروسی و روش‌های غیر ویروسی است. تا به حال از وکتورهایی بر پایه رتروویروس، لنتی ویروس، آدنو/هرپس ویروس در انتقال ژن استفاده شده است. عموماً وکتور ویروسی نوترکیب توسط جابه جایی جزئی ژنوم ویروس با ژن‌های درمانی تولید می‌شود. اگر چه یک وکتور ویروسی می‌تواند سلول‌ها را با کارایی نسبتاً خوب آلوده کند، ریسک رونویسی از ژن‌های ویروسی و اتصال این ژن‌ها به ژنوم میزبان هم چنان وجود دارد. همچنین تولید ذرات ویروسی نیازمند تخصص و مهارت بالایی است. وکتورهای غیر ویروسی همانند پلاسمیدهایی که می‌توانند بداخل سلول‌ها از طریق انتقال لیپوزوم یا الکتروپوریشن وارد شوند در دسترس‌اند. این‌ها در بدن موجود زنده بدون خطر بوده و کاربرد راحت دارند. ترانسفکشن موفقیت آمیز با وکتورهای غیر ویروسی به ویژه لیپوزوم‌ها در پیوند به کار گرفته شده است. بهترین کاندیدها به عنوان هدف برای انتقال ژن غیر ویروسی، سلول‌هایی با پتانسیل تکثیر و خودنوزایی می‌باشند. بنابراین، سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به عنوان منابع جالب برای سازوکارهای غیر ویروسی در نظر گرفته می‌شوند (۱۷، ۱۳).

اساس این روش بار الکتریکی، ماهیت گویچه‌های لیپیدی (لیپوزوم)، توانایی آنها در گذر از غشای سلول‌ها و ورود به آنها می‌باشد. در واقع در



گذاری شد. سلول‌های تشکیل دهنده پلیت (متشکل از سلول‌های سرتولی و اسپرمتوگونی) در محلول DMEM حاوی آنتی بیوتیک و FBS ۱۰٪ قرار گرفتند.

شمارش و ارزیابی درصد حیات: برای ارزیابی وضعیت حیات سلول‌ها، رنگ آمیزی تریپان بلوانجام گرفت و تعداد کل سلول‌ها و همچنین سلول‌های زنده و مرده حاضر در سوسپانسیون سلولی، توسط هموسیتمتر و میکروسکوپ نوری بدست آمد.

کشت کوتاه مدت: در این روش از پلیت‌های ۲۴ خانه (TPP Switzerland) پوشیده از ۵ μg/ml لکتین داجور استرامونوم آگلوٹینین در بافر فسفات استفاده شد. تعلیق سلولی حاصل از مرحله قبل به این پلیت‌ها منتقل شده و در دمای ۳۷°C و میزان ۵٪ CO₂، انکوبه شد. در این روش سلول‌های سرتولی به کف پلیت چسبیده و سلول‌های اسپرمتوگونی بر روی سلول‌های سرتولی تشکیل کلونی می‌دهند.

ارزیابی کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی: کلونی‌های اسپرمتوگونی در هر گوده با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus inverted microscope IX71) در روزهای ۱۰، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴ و ۱۱ پس از کشت شمارش شد.

تأیید ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی: ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی با رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت علیه vimentine و OCT-۴ که به ترتیب مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها هستند تأیید شد. بدین منظور سلول‌ها (سوسپانسیون سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی) در گوده‌های ۴ خانه‌ای پوشیده شده از ۵۰۰۰۰ سلول در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و FBS ۱۰٪ در ۳۷°C در humidified atmosphere با ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. کشت بعد از ۵ روز متوقف و سلول‌ها فیکس شدند. آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای شناسایی oct4 در SSCs، rabbit anti-OCT4 (Abcam, Cambridge, UK)، polyclonal antibody ab1۸۹۷۶، FITC-conjugated goat و anti rabbit IgG می‌باشند. آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای مشاهده vimentine در سلول‌های سرتولی anti-vimentin (Abcam, Cambridge, UK, monoclonal antibody ab۸۰۶۹ fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep و anti mouse IgG می‌باشند. رنگ آمیزی سلول‌ها براساس مطالعات گذشته توسط Qasemi-Panahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد.

استخراج پلازمید: در این مطالعه از سازه ژنی EGFP-۲ PIRES خطی شده با آنزیم stu1 و نشان دار شده با تترامیتیل رودامین استفاده شد (آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران). (تصویر ۱). طول کلی این سازه ۵/۳k جفت باز است. این سازه دارای ریپوزوم اینتری سایت (IRES) متعلق به ویروس آنسفالومیوکاریدیت (ECMV)

طی این روش ما سازه ژنی ساخته شده را وارد گویچه لیپیدی کرده و سپس آن را در کنار سلول پذیرنده قرار می‌دهیم. آنگاه لیپوزوم وارد سلول پذیرنده می‌شود و با خود ساختار ژنی مورد نظر ما را نیز وارد می‌کند. مکانیسم دقیق دربرگیری DNA هنوز نامشخص است. نوع سلول، نوع لیپوزوم، میزان اختصاصی بودن و شباهت لیپوزوم به سلول هدف بسیار در موفقیت امر مهم است (۵).

هدف از انجام این طرح، بررسی انتقال ژن Enhanced Green Fluorescent Protein به کلونی اسپرمتوگونی توسط روش غیروبروسی لیپوفکشن و بدست آوردن بهترین روز انکوباسیون در بالاترین میزان جذب ژن خارجی توسط سلول‌های اسپرمتوگونی گاوی می‌باشد.

مواد و روش کار

حیوانات: در این مطالعه، ۵ گوساله نر نژاد هلشتاین ۳ تا ۵ ماهه به عنوان دهنده استفاده شدند. در زمان بیوپسی، محیط اسکروتوم بین ۱۳cm تا ۱۵ بود. حیوانات طبق آیین نامه کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه تهران نگهداری و رفتار شدند.

بدست آوردن نمونه بیضه: در این مطالعه با استفاده از روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE)، نمونه بیوپسی ۳×۳mm از بیضه ۵ رأس گوساله نر گرفته شد و این نمونه‌ها داخل محیط کشت DMEM در عرض ۲ ساعت همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی سلول: سلول‌های لوله‌ای انفرادی در دو مرحله هضم آنزیمی که قبلاً توسط Izadyar و همکاران در ۲۰۰۲ توصیف شده بود، جدا شدند. به طور خلاصه، پس از شستشوی نمونه به میزان ۳ بار در محیط کشت DMEM حاوی اسید آمینه‌های غیر ضروری، ۱۰۰ unit/ml پنی سیلین، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین و ۴۰ mg/ml جنتامایسین، بیوپسی به صورت مکانیکی توسط قیچی استریل قطعه قطعه شد. سپس در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک به همراه ۱ mg/ml کلانزات تیب IV، ۱ mg/ml هیالورونیداز تیب II و ۱ mg/ml تریپسین و ۵ mg/ml DNase (تمام آنزیم‌ها از Sigma) در ۳۷°C در انکوباتور شیکر با ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. در این مرحله قسمت اعظم بافت همبند و بینابینی از هضم شده و بعد از سه تا چهار بار شستشو با DMEM، اکثر لوله‌های سمینی فروس رسوب کردند. لوله‌های سمینی فروس دوباره در DMEM حاوی آنتی بیوتیک شامل آنزیم‌های بالا ولی این بار بدون حضور تریپسین انکوبه شدند. این مرحله تا زمانی پیش رفت که قطعات لوله‌های سمینی فروس از بین رفته و سلول‌های همراه آن (برای مثال سلول‌های سرتولی و اسپرمتوگونی) از هم جدا شدند. سلول‌های جدا شده از باقیمانده قطعات لوله‌های سمینی فروس توسط سانتریفیوژ ۳۰g به مدت ۲ دقیقه جدا شدند. بعد از عبور سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ و ۷۷ میکرومتری، این سوسپانسیون سلولی در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰٪ پلیت



ارزیابی آماری: اطلاعات بدست آمده از ۵ نمونه گیری مستقل توسط آزمون‌های آماری One-way ANOVA و Duncan's multiple range test (SPSS Inc.) SPSS مورد استفاده (۱۶ Chicago, version) بوده و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی درصد حیات: پس از جداسازی سلول‌های انفرادی از باقیمانده لوله‌های سمینی فروس، توسط رنگ آمیزی تریپان بلو مشخص گردید که حدود ۸۸٪ این سلول‌ها زنده هستند.

کشت کوتاه مدت: جمعیت سلولی جدا شده از لوله‌های سمینی فروس بیضه گوساله ۳ تا ۵ ماهه حاوی اغلب دو نوع سلولی با ویژگی‌های ریخت شناسی متفاوت بود. اولین نوع سلولی که تکثیر می‌یابد تک لایه‌ای از سلول‌ها به وجود می‌آوردند در حالیکه نوع دیگر سلول بعد از تکثیر، تشکیل کلونی می‌دهد (تصویر ۲).

تأیید ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: در روز ۵ کشت، vimentin در سلول‌های سرتولی و OCT4 در کلونی‌های اسپرماتوگونی دیده می‌شود (تصویر ۳).

انتقال ژن EGFP به کلونی‌های اسپرماتوگونی به روش لیپوفکشن: قبل از مشاهده میزان ترانسفکشن در کلونی اسپرماتوگونی در هر سه روز مطالعه، تعداد کلونی اسپرماتوگونی شمارش شد (جدول ۱، ۳، ۵). در هر سه روز ۴، ۶ و ۸ کشت که لیپوفکشن انجام شد تعداد کلونی‌های آلوده شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. این تفاوت معنی‌دار نیز در گروهی که هیچ حاملی برای انتقال ژن خارجی به کلونی اسپرماتوگونی وجود نداشت بود به چشم می‌خورد ($p < 0.05$) (جدول ۲، ۴، ۶). از طرفی در روز ۴ و ۶ تعدادی از کلونی‌ها نیز در گروه بدون حامل ژن خارجی آلوده شده

جدول ۱. تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۴ کشت.

روزهای بررسی	۵	۶	۷
گروه‌های آزمایش	۱۸/۶	۱۹/۲	۲۰
شاهد			
همراه DNA	۲۰/۸	۲۷/۸	۲۲
همراه Lipofectamine + DNA	۲۱	۲۲	۲۳

جدول ۲. میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط لیپوفکشن هنگامیکه آزمایش از روز ۴ شروع شد (SD).^a ^b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنی‌دار است ($p < 0.05$).

روزهای بررسی	۵	۶	۷
گروه‌های آزمایش	۲۹/۸ ± ۷ ^b	۳۴ ± ۶/۶ ^b	۳۷ ± ۶/۵ ^b
شاهد	۰ ^a	۰ ^a	۰ ^a
همراه DNA	۰ ^a	۰/۸ ± ۰/۸ ^a	۷/۶ ± ۷/۶ ^a
همراه Lipofectamine + DNA	۲۹/۸ ± ۷ ^b	۳۴ ± ۶/۶ ^b	۳۷ ± ۶/۵ ^b

است که در بین قطعه مالتیپل کلونینگ سایت (MCS) و انهنسد گرین فلورسنت پروتئین (EGFP) قرار گرفته است. این سازه هم چنین دارای یک ژن مقاومت نسبت به نئومایسین/کانامایسین می‌باشد. این پلازمید دارای ماکزیمم برانگیختگی در ۴۸۸nm و بیشترین بازتاب در ۵۰۷nm می‌باشد. برای خالص سازی پلازمید از پروتکل تجاری (iNtRON DNA-midiTM Plasmid ۲/۰ Biotechnology, INC. Version DNA Purification Kit استفاده شد.

تریپسینه کردن کوتاه مدت (هضم نسبی): قبل از فرآیند انتقال ژن، لازم است که کلونی‌های اسپرماتوگونی تا حد امکان پخش شده و از تراکم آنها کاسته شود. بدین منظور از تلفیق روش مکانیکی و هضم شیمیایی درست روز قبل ترانسفکشن استفاده شد. بدین منظور بعد از خالی کردن محیط کشت سلول‌ها و شستشوی ظرف کشت با محیط فاقد سرم یا PBS، بین ۰/۵ تا ۱ از آنزیم تریپسین ۰/۵٪ حاوی EDTA (invitrogen) به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ دقیقه انکوبه شدند. در طی این زمان، با ضربات آهسته مکانیکی به کف ظرف کشت، روند کاهش تراکم و جداسازی نسبی کلونی‌ها تسهیل شد. به محض کنده شدن کلونی‌ها از کف ظرف، به منظور خنثی سازی روند هضم شیمیایی ۱/۳ حجم تریپسین FBS اضافه شد.

انتقال ژن GFP با استفاده از حاملین لیپوزومی (لیپوفکشن): در این مطالعه به منظور انتقال ژن به کلونی اسپرماتوگونی گوساله با استفاده از حاملین لیپوزومی از Lipofectamine ۲۰۰۰ DNA Transfection Reagent ساخت شرکت Invitrogen استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن سوسپانسیون سلولی باید در فاز رشد لگاریتمی باشد. به طور خلاصه به منظور لیپوفکشن، ۴μl از لیپوفکتامین در ۲۵μl محیط DMEM و ۲μl از DNA (پلازمید) را در ۲۵μl DMEM رقیق کرده، سپس لیپوفکتامین رقیق شده را به DNA رقیق شده در یک میکروتیوپ استریل اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷°C به هر گوده ۵۰μl از کمپلکس DNA-Lipofectamine اضافه می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی بهترین روز که در آن بیشترین میزان آلوده سازی کلونی‌های اسپرماتوگونی به واسطه lipofectamine به دست آید در سه روز ۴، ۶ و ۸ از کشت، ترانسفکشن انجام و نتایج تا ۳ روز متعاقب هر ترانسفکشن تعقیب شد. قبل از ارزیابی میزان نفوذ پلازمید به کلونی اسپرماتوگونی در هر روز، تعداد کلونی اسپرماتوگونی در هر گروه آزمایشی با استفاده از میکروسکوپ معکوس شمارش شد. به منظور تعیین وجود ژن انتقالی در کلونی اسپرماتوگونی با قرار دادن سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانس معکوس (NIKON (ECLIPSE EF۶۰۰) و با استفاده از اشعه UV طول موج ۴۶۰-۵۰۰ (فیلتر آبی) بررسی گردید. اگر انتقال ژن موفقیت آمیز باشد رنگ سبز فلورسانتی از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به چشم می‌خورد که تأیید تقریبی انتقال ژن است.



جدول ۳. تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۶ کشت.

روزهای بررسی	۷	۸	۹
شاهد	۳۲	۳۳/۲	۳۴/۴
همراه DNA	۳۵/۸	۳۸/۲	۳۸/۸
همراه Lipofectamine + DNA	۳۲	۳۲/۵	۳۵/۷

جدول ۴. میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط لیپوفکتامین هنگامیکه آزمایش از روز ۶ شروع شد (±SD).^{a,b} ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

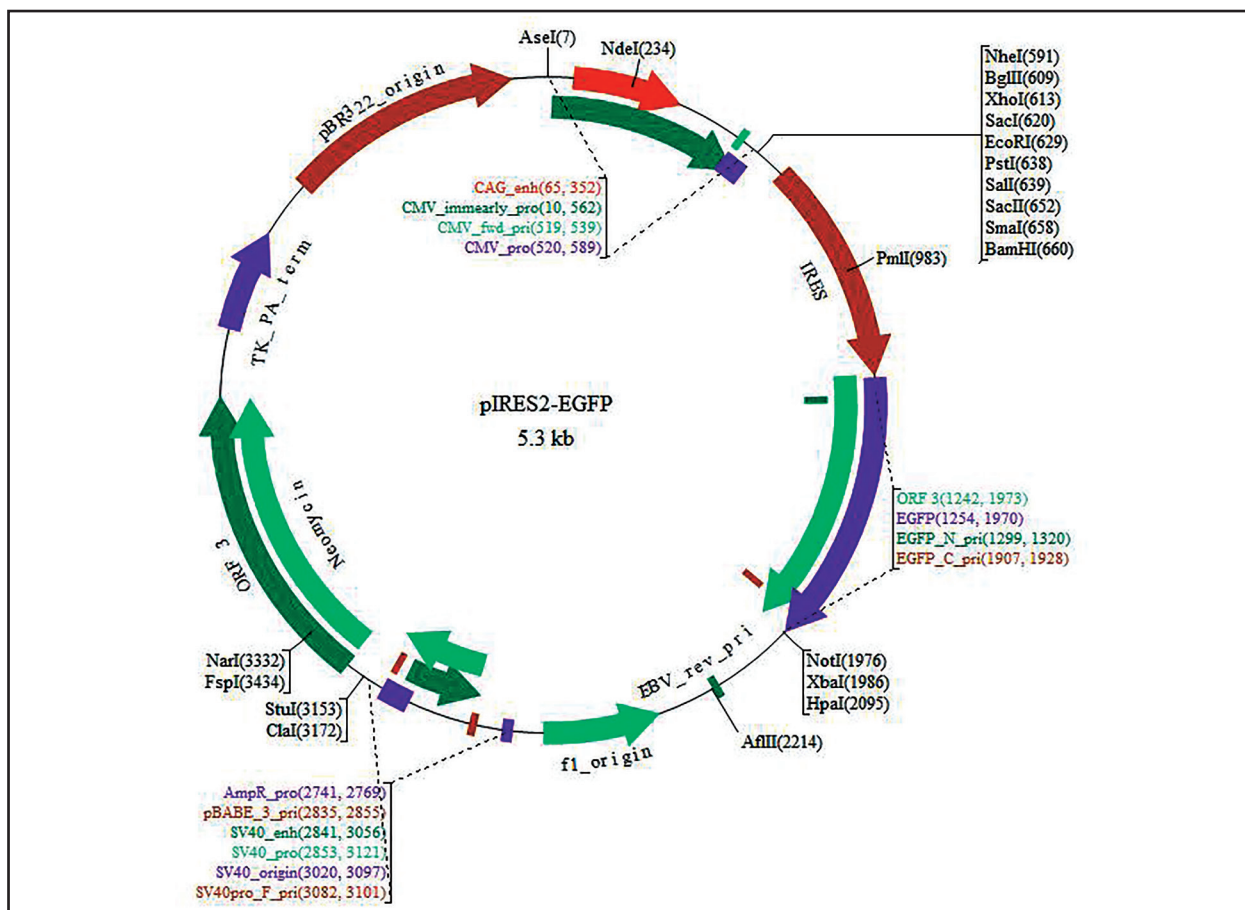
روزهای بررسی	۷	۸	۹
شاهد	۰ ^a	۰ ^a	۰ ^a
همراه DNA	۰ ^a	۱±۱ ^a	۱±۱ ^a
همراه Lipofectamine + DNA	۱۲/۲±۳ ^b	۱۴/۸±۳/۱ ^b	۱۸/۴±۳/۶ ^b

جدول ۵. تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۸ کشت.

روزهای بررسی	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۴۳	۴۴	۴۴/۶
همراه DNA	۳۸/۴	۳۹/۴	۴۰
همراه Lipofectamine + DNA	۴۱	۴۱/۹	۴۲/۴

جدول ۶. میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط لیپوفکتامین هنگامیکه آزمایش از روز ۸ شروع شد (±SD).^{a,b} ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

روزهای بررسی	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۰ ^a	۰	۰ ^a
همراه DNA	۰ ^a	۰ ^a	۰ ^a
همراه Lipofectamine+ DNA	۲/۶±۰/۴ ^b	۲/۴±۰/۲ ^b	۳/۲±۰/۴ ^b



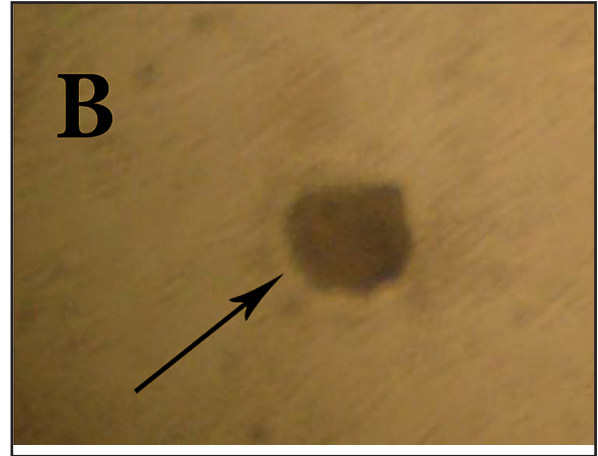
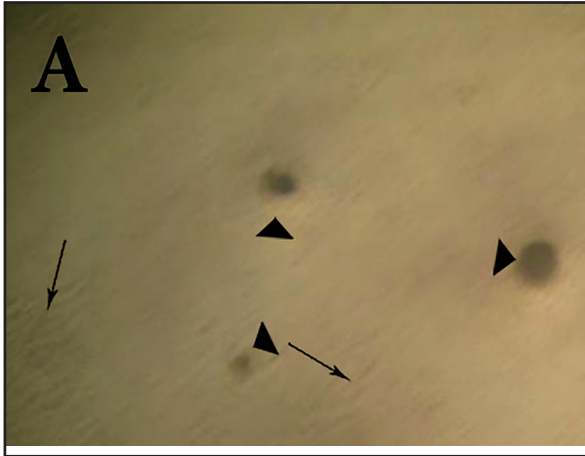
تصویر ۱. نقشه ژنی پلازمید EGFP-۲ PIRES

بحث

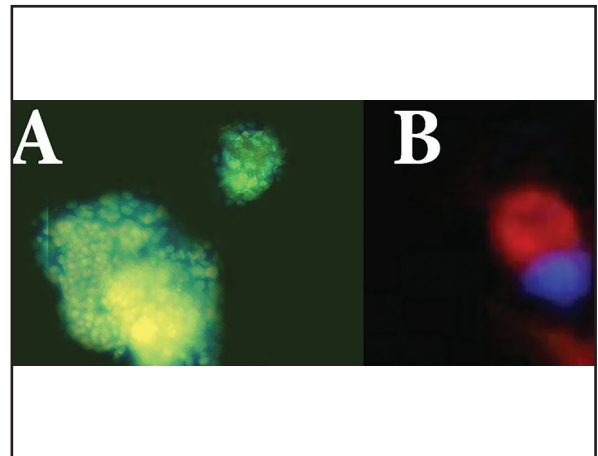
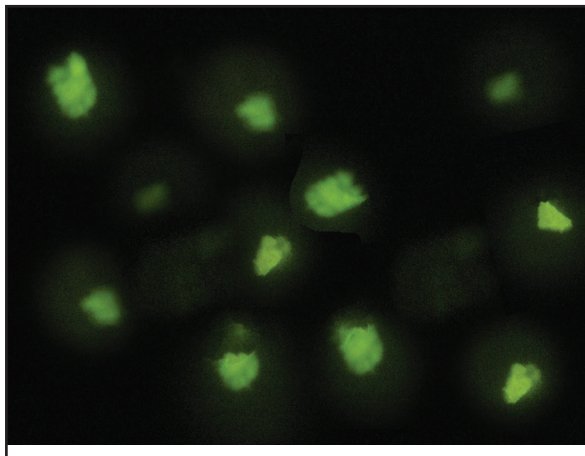
به طور معمول جمعیت متراکمی از سلول بنیادی اسپرماتوگونی با خلوص بالای حدود ۱×۱۰ سلول بنیادی در هر گرم بافت بیضه با میزان زنده مانی < ۸۰٪ می‌باشد (۹). میزان زنده مانی به دست آمده در مطالعه حاضر نیز قابل مقایسه با مطالعات انجام شده بر روی موش نابالغ (۲)، رت

بودند (جدول ۲، ۴). در حالی که در روز ۸ هیچ کلونی جذب خودبه خودی نداشت (جدول ۶). نرخ آلوده سازی کلونی زمانی که ترانسفکشن در روز ۴ کشت انجام شد بالاتر از روز ۶ و ۸ بود (جدول ۲). رنگ سبز فلورسنت بیانگر انتقال ژن EGFP به کلونی اسپرماتوگونی است (تصویر ۴).





تصویر ۲. (A) سلول‌های سرتولی یک لایه تکی از سلول را تشکیل می‌دهند (پیکان). چند کلونی کوچک اسپرماتوگونی نیز دیده می‌شود (مثلث) (B) ریخت شناسی یک کلونی اسپرماتوگونی تشکیل شده روی لایه سلول‌های سرتولی (بزرگنمایی ۱۰۰×).



تصویر ۴. رنگ سبز فلورسنت که به صورت پراکنده در کلونی‌های اسپرماتوگونی گاو در روز ۴ ترانسفکشن مشاهده می‌شود.

تصویر ۳. (A) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو برای Oct4. (B) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های سرتولی گاو برای Vimentin در روز ۵ کشت (بزرگنمایی ۴۰۰×).

در تعیین بهترین روزی که بیشترین میزان جذب پلازمید در کلونی‌های اسپرماتوگونی وجود داشته باشد نشان داد که پیک فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها در زمان ترانسفکشن دارای اهمیت فوق العاده‌ای می‌باشد. در مقایسه با سه روز، در روز ۴ کشت بیشترین نرخ ترانسفکشن مشاهده شد که به پیک فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها اشاره دارد. این یافته با مطالعه Takehashi و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از وکتور آدنو ویروسی در گونه موش مطابقت دارد (۲۱). از طرفی در روز ۴ بالاترین میزان جذب DNA بدون حامل توسط کلونی اسپرماتوگونی نیز مشاهده شد. در روز ۶ ترانسفکشن، میزان جذب DNA بدون حامل به طور ثابت و تنها در دو روز مشاهده شد. این یافته در مغایرت با بررسی صورت گرفته روی جذب DNA بدون حامل در اسپرم موش بود (۲۳). در روز ۸ ترانسفکشن علاوه بر اینکه درصد کلونی‌های آلوده به ژن خارجی بسیار کم بود، هیچ گونه جذب DNA بدون حامل در کلونی‌های اسپرماتوگونی مشاهده نشد. که این امر می‌تواند نشان دهنده سیر نزولی تعداد و نیز زنده ماندن کلونی‌های اسپرماتوگونی می‌باشد (۵).

(۳)، خوک (۱۴) و گوساله (۱۰) می‌باشد. در این مطالعه سلول‌های جدا شده از لوله‌های سمینی فرس گوساله ۳ تا ۵ ماهه دو نوع سلول با ویژگی‌های ایمنوسیتوشیمی متفاوت، مشابه سلول‌های سرتولی و تیپ A سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال دارا بودند. این یافته در مطابقت با گزارشات Kourji و همکاران در سال ۲۰۰۷ که ویژگی‌های ایمنوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش نشان دادند بود (۱۱). مارکر اختصاصی برای شناسایی سلول‌های سرتولی، رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی vimentin بود (۱،۲۰). کلونی‌ها ریخت شناسی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو را داشتند (۹). بنابراین ما نتیجه گرفتیم که کلونی‌ها از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منشأ گرفتند. در این مطالعه، از lipofectamine ۲۰۰۰ به منظور جذب ژن خارجی EGFP به کلونی‌های اسپرماتوگونی استفاده شد. نتایج نشان داد جذب ژن خارجی توسط حامل لیپوزومی در هر سه روز لیپوفکشن نسبت به بدون حامل افزایش معنی‌داری دارد. (جدول ۶، ۴، ۲) یافته‌های این بررسی



تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت محترم قطب کاربرد سلول‌های بنیادی در سلول درمانی و مهندسی بافت دانشگاه تهران که هزینه انجام این طرح را متقبل شدند کمال تشکر را به جا آورند.

References

1. Anway, M.D., Folmer, J., Wright, W.W. (2003) Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of sertoli cell function. *Biol Reprod.* 68: 996-1002.
2. Bellue, A.R., Caricchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M. (1977) Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and characterization. *J Cell Biol.* 74: 1-9.
3. Brinster, R.L., Avarbock, M.R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 11303-7.
4. Dirami, G., Ravindranath, N., Pursel, V., Dym, M. (1999) Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia culture in KSOM. *Biol Reprod.* 61: 225-230.
5. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 7413-7417.
6. Garrett, F.E., Goel, S.H., Yasul, J., Koch, R.A. (1999) Liposome fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermant agents. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1417: 77-88.
7. Horfmann, M.C. (2008) Gdnf signaling pathways whitin the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol.* 288: 95-103.
8. Hui-ming, J., Bal, L., Ren, H., MU, Y. (2011) Production of transgenic mice by type A spermatogonia-mediated gene transfer. *Agricult Sci-China.* 10: 431-437.
9. Izadyar, F., Creemers, L.B., Van Dissel-Emiliani, F.M. (2000) Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol Cell Endocrinol.* 169: 21-26.

مطالعات صورت گرفته بر تولید سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ترانسژنیک، بیشتر بر پایه مطالعات *in vivo* یعنی تزریق ژن خارجی به داخل بیضه صورت گرفته است (testis-mediated gene transfer). در همین رابطه، Hui ming و همکاران در سال ۲۰۱۱، ژن نشانگر GFP را به داخل بیضه‌های موش جوان ۷ روزه برای بررسی‌های بعدی روش TMGT و محدودیت‌های احتمالی وارد کردند. سپس در هفته‌های ۶، ۱۲ و ۲۴، این موش‌های مذکر TMGT شده با موش‌های مونث آمیزش داده شدند و بیان و الحاق ژن EGFP معرفی شده در نوزادان ترانسژنیک F1 ارزیابی شد (۸).

Nagona و همکاران در سال ۲۰۰۱، نشان دادند که اگر چه وکتورهای رتروویروسی به عنوان روش مؤثر در ورود ژن‌ها به داخل طیف وسیعی از سلول‌ها به کار گرفته می‌شود، اما سلول‌های بنیادی زایای پس از تولد نوعی مقاومت در مقابل آلوده سازی به ژن خارجی توسط این ویروس‌ها از خود نشان می‌دهند. به علاوه، بیان ژن وارد شده به داخل انواع متفاوت سلول بنیادی، همانند سلول بنیادی جنینی یا سلول بنیادی خونساز اغلب بسیار ضعیف یا خاموش است. آنها نشان دادند که انتقال ژن به وسیله حامل رتروویروسی در شرایط آزمایشگاهی به داخل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش‌های نابالغ و نیز بالغ، منتج به انضمام پایدار و بیان یک ترانسژن تنها در ۲-۲۰٪ سلول‌های بنیادی شد (۱۶).

این اولین مطالعه‌ای است که به بررسی ورود ژن به کلونی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی با استفاده از حاملین لیپوزومی می‌پردازد. اساس این روش بار الکتریکی، ماهیت گویچه‌های لیپیدی (لیپوزوم)، توانایی آنها در گذر از غشای سلول‌ها و ورود به آنها می‌باشد. در واقع در طی این روش ما سازه ژنی ساخته شده را وارد گویچه لیپیدی کرده و سپس آن را در کنار سلول پذیرنده قرار می‌دهیم آنگاه لیپوزوم وارد سلول پذیرنده می‌شود و با خود ساختار ژنی مورد نظر ما را نیز وارد می‌کند. مکانیسم دقیق دربرگیری DNA هنوز نامشخص است. نوع سلول، نوع لیپوزوم، میزان اختصاصی بودن و شباهت لیپوزوم به سلول هدف بسیار در موفقیت امر مهم است (۵).

گفته می‌شود که استفاده از لیپوزوم برای ترانسفکشن سلول می‌تواند از DNA در برابر نوکلئازهای آندوژن محافظت کند. اجتناب از میان کنش مستقیم DNA خارجی با غشاماند استفاده از لیپوزوم این اجازه را می‌دهد که DNA خارجی با گذر از غشا به هسته برسد و بدین ترتیب باعث کشیده شدن ماشه آپوپتوزیز نشود (۱۹).

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از حاملین لیپوزومی یک روش کم خطر، ایمن و با کارایی نسبتاً بالا در انتقال ژن خارجی به کلونی اسپرماتوگونیال می‌باشد. همچنین امیدها برای فراهم شدن شرایط تمایز در محیط آزمایشگاهی به منظور تولید اسپرم ترازیخته از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قوت می‌گیرد.



10. Izadyar, F., Sepierenberg, G.T., Creemers, L. B., Ouden, K., Rooij, D.G. (2002) Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*. 124: 85-94.
11. Koruji, S.M., Movahedin, M., Mowia, S.J. (2007) Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Iran J Reprod Med*. 5: 109-115.
12. Kubota, H., Brinster, R.L. (2008) Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol*. 86: 59-84.
13. Lai, Y., Drobinskaya, I., Chuguang, L. (2008) Genetic modification of cells for transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 146-159.
14. Morena, A.R., Boitani, C., Pesce, M., De felici, M., Stefanini, M. (1996) Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl*. 17: 708-717.
15. Nagona, M., Clayton, J., Kley, E., Mary, R. (2001) Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *PNAS*. 98: 13090-13095.
16. Niu, Y., Liang, SH. (2008) Progress in gene transfer by germ cells in mammals. *J Genet Genomics*. 35: 701-714.
17. Ogachi, S., Kamihira, M., You, J., Tachibana, A., Lijima, Sh. (1998) Exogene gene transfection into quail embryo using cationic lipid vesicles. *J Fermentation and Bioengineering*. 86: 118-120.
18. Qasemi-Panahi, B., Tajik, P., Movahedin, M., Moghaddam, G., Barzgar, Y., Heidari-vala, H. (2011) Differentiation of bovine spermatogonial stem cells into osteoblasts. *Avicenna J Med Biotechnol*. 3: 149-153.
19. Sciamanna, I. (2002) DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Mol Reprod Develop*. 56: 301-305.
20. Tajik, P., Barin, A., Movahedin, M. (2012) Nestin, a neuroectodermal stem cell marker, is expressed by bovine sertoli cells. *Comp Clin Pathol*. 21: 395-399.
21. Takehashi, M., Kanatusa-Shinohara M., Ogonuki N., Miki, H., Toyokuni, SH., Shinohara, T. (2007) Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *PNAS*. 104: 2596-2601.
22. Xiang-yang, M. (2011) Production of transgenic animals using spermatogonial stem cells. *Agricult Sci China*. 10: 762-768.
23. Younezawa, T., Furahata, Y., Hirabayashi, K., Suzuki, M., Yamanouchi, K. (2002) Protamine-Driven synthetic enhanced the efficiency of sperm-mediated gene transfer using liposome-peptid-DNA complex. *J Reprod Develop*. 48: 281-286.



Transfection of EGFP to bovine spermatogonial colony through lipofection

Fazle Elahy, Z.¹, Tajik, P.^{1*}, Hoseini Pajooh, K.², Javdani Shahedin, G.¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

²Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Sciences and Technology, Tehran-Iran

(Received 20 January 2016, Accepted 29 February 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Spermatogonial Stem Cells (SSCs) are the only stem cells in adults that can transfer genetic information to future generations. Considering that a single SSC gives rise to a vast number of spermatozoa, genetic manipulation of these cells is a potential novel technology with practical application to various animal species. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) gene transfection into bovine spermatogonial colonies via liposome carrier and assess the best incubation day in uptake exogenous gene by spermatogonial colonies. **METHODS:** Transfection efficiency EGFP gene through lipofection was determined different in three days (day 4, 6 and 8) after the beginning of the culture by fluorescent microscope. Immunofluorescent staining against OCT4 and vimentin led to the confirmation of the nature of both SSCs and sertoli cells. **RESULTS:** Results showed that the transfected colonies through lipofection increased significantly ($p < 0.05$) in each three days of transfection in comparison with those of the control groups. The transfection colonies were higher (significant) in comparison with those of the free exogenous gene carrier groups. The rate of infected colonies was higher when transfection proceed day 4. **CONCLUSIONS:** It was concluded that lipofectamine can be used safely for direct loading of exogenous DNA to spermatogonia colony, particularly during the fourth day of culture.

Keyword: lipofectamine, spermatogonial stem cells, transfection

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The total number of spermatogonial colony at day 4 of culture.

Table 2. The rate of DNA transfection to bovine spermatogonial colony through lipofectamine when the experiment begun at day 4 of culture (\pm SD).

Table 3. The total number of spermatogonial colony at day 6 of culture.

Table 4. The rate of DNA transfection to bovine spermatogonial colony through lipofectamine when the experiment begun at day 6 of culture (\pm SD).

Table 5. The total number of spermatogonial colony at day 8 of culture.

Table 6. The rate of DNA transfection to bovine spermatogonial colony through lipofectamine when the experiment begun at day 8 of culture (\pm SD).

Figure 1. PIRESE2-EGFP plasmid map.

Figure 2. (A) Developing sertoli cells that created a monolayer of cell (arrows) and small spermatogonial colonies (triangle) (B) The morphology of a spermatogonial derived colony that form on a monolayer of Sertoli cells (magnification $\times 100$).

Figure 3. (A) Immunofluorescent staining of spermatogonial stem cells for Oct4. (B) Immunofluorescent staining of sertoli cells for Vimentin at day 5 of culture. (magnification $\times 400$).

Figure 4. Observing green fluorescent color in spermatogonial colonies at day 4 of transfection.

