تولیدات دامی
دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷
صفحه‌های ۲۱۲-۲۰۳

همسانه‌سازی ژن زیرواحد بتا هورمون گونادوتروپین جفت انسانی در پی انتقال ژن به اسپرم خروس

مهدی نورانی[۱]، شعبان رحیمی[۲]*، عبدالحسین شاهوردی[۳]، و محسن شرفی[۴]

۱. کارشناسی ارشد، گروه علوم طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. استاد، گروه علوم طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت، تهران، ایران
۳. استاد، گروه جنین‌شناسی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۲۷

چکیده

هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی زیرواحد بتای هورمون گونادوتروپین جفت انسانی در ناقل مناسب بود که بتواند از طریق اسپرم در تولید طیور تراریخت به‌کار گرفته شود. به این منظور زیرواحد بتای این هورمون به کمک یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر و در ناقل T همسانه‌سازی شد. فرآیند ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی انجام گرفت و کلونی‌های دارای پلاسمید نوترکیب به‌وسیله PCR انتخاب شدند. صحت تخلیص پلاسمید ابتدا توسط هضم آنزیمی و نهایتاً به‌روش توالی‌یابی بررسی شد. پس از آن، زنجیره بتا از ناقل T جداسازی شد و مجدداً در ناقل بیانی pcDNA3.1+ همسانه‌سازی شد. نتایج آنالیز آنزیمی و تعیین توالی نشان داد که پلاسمید نوترکیب pCDNA3.1+/hCGβ با توالی صحیح ساخته شد و تطابق کامل با ژن زیرواحد بتای هورمون گونادوتروپین جفت انسانی داشت. می‌توان نتیجه گرفت که پلاسمید نوترکیب حاوی زیرواحد بتای گونادوتروپین جفت انسانی ساختار مناسبی برای انتقال به اسپرم خروس دارد که می‌تواند در تولید جوجه‌های تراریخت به‌کار گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، پلاسمید، توالی‌یابی، جوجه تراریخت.

* نویسنده مسئول
Email: rahimi_s@modares.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، توانایی ایجاد تغییرات ژنتیکی در حیوانات پیشرفت عظیمی را در علم زیست‌فناوری به‌وجود آورده است. فناوری حیوانات تراریخت، امکان پیوند رشته‌های مختلف برای تولید پروتئین‌های حیاتی را به‌صورت نوترکیب فراهم نموده است. امروزه پرندگان تراریخت به‌عنوان یک ابزار مهم تحقیقاتی و نیز بیوراکتور تولیدکننده پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. یکی از مهمترین فناوری‌های دستیابی به حیوانات تراریخت، همسانه‌سازی صحیح ژن موردنظر متناسب با ناقل و روش انتقال ژن است که به مفهوم وارد شدن یک توالی DNA خارجی به داخل ژنوم یک موجود زنده چندسلولی می‌باشد به‌طوری‌که ژن موردنظر در اغلب سلول‌های آن حضور داشته و به نسل بعد منتقل شود [۳]. در این روش، ابتدا یک قطعه DNA به درون سلول میزبان انتقال داده شده و سپس قطعه مزبور توسط آنزیم‌های محدودکننده از ژنوم جدا شده و به کمک آنزیم لیگاز به قطعات DNA دیگری به نام ناقل متصل می‌شود. سپس این ناقل‌های نوترکیب (حاوی مولکول DNA بیگانه) به سلول میزبان جدید منتقل می‌گردند [۳].

ژن هورمون گونادوتروپین جفتی انسانی (hCG) از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده است. تولید هورمون hCG در طول دوران بارداری توسط جفت و در برخی سرطان‌ها توسط تومورها صورت می‌گیرد. به‌ویژه حضور hCG و زیرواحدهای آن مخصوصاً βhCG در انواع مختلف سلول‌های سرطانی، با روش فلوسایتومتری نشان داده شده است [٤ و ٥]. از کاربردهای مهم این هورمون به‌عنوان دارو برای تشخیص و درمان عارضه کریپتورکیدیسم (نهان بیضگی) قبل از بلوغ می‌باشد. همچنین، در درمان ناباروری ناشی از عملکرد نامناسب هیپوفیز در مردان و درمان ناباروری در زنان همراه با مونوتروپین HMG (محرک تخمک‌گذاری و اسپرماتوژنز که حاوی ترکیب FSH و LH است) یا کلومیفن (با نام تجاری کلامید برای درمان ناباروری ناشی از کاهش یا فقدان تخمک‌ریزی در زنان) استفاده می‌گردد. یکی دیگر از کاربردهای مهم آن تحریک تخمک‌ریزی در عمل باروری خارج از بدن (IVF) می‌باشد [۵].

ژن این هورمون تاکنون برای اهداف مختلف همسانه‌سازی شده است. در بعضی پژوهش‌ها ساخت این ژن با هدف تهیه ساختارهای متفاوت برای تولید هورمون نوترکیب انجام شده است. در بیشتر این مطالعات همسانه‌سازی این ساختار در ناقل بیانی pCDNA3.1+ جهت انتقال و بیان ژن در سلول‌های پستانداران انجام شده است [۱۲]. ساختارهایی که با اتصال زیرواحد بتا و زیرواحد آلفا تشکیل شده‌اند منجر به تشکیل یک زیرواحد فعال در سیستم بیانی CHO می‌شود که در نهایت منجر به تولید محصول این ژن به‌صورت نوترکیب می‌شود [۱۲]. تاکنون مطالعه‌ای به‌منظور همسانه‌سازی این ژن با هدف انتقال آن به سلول اسپرم در پرندگان صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی قطعه‌ای از این ژن (زیرواحد بتا) در ناقل بیانی سازگار با سلول اسپرم پرندگان بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، باکتری Dh5α حاوی ناقل Pcmv-xl5 که حامل ژن hCGβ انسانی بود از آزمایشگاه ژنتیک مولکولی گروه ژنتیک پژوهشگاه رویان تهیه شد. سپس باکتری ذکرشده تکثیر و پلاسمید حاوی ژن از آن با کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت آلمانی Roche استخراج شد. ابتدا آغازگر مناسب برای جداسازی قطعه ژنی زنجیره بتا از وکتور طراحی شد که توالی آغازگرهای مورد استفاده به ترتیب زیر بود.

FOR: 5'AAGCTTGCCACCATGGAGATGTTC3'

Hind III: A↓A G C T T

REV: 5'CTCGAGTTATTGTGGGAGGATCGG3'
XhoI: C↓T C G A G

برای جداسازی و تکثیر قطعه موردنظر، از پلاسمید Pcmv-xl5 نوترکیب به عنوان الگو، استفاده شد و سپس واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. لازم به ذکر است که قبل از انجام PCR، دماهای مختلف برای اتصال آغازگر به الگو (Annealing) جهت واکنش PCR مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد برای قطعه موردنظر به‌عنوان بهترین دمای انجام در نظر گرفته شد. به‌دلیل اینکه آغازگرهای طراحی‌شده فاقد جایگاه نشست بودند، بنابراین ژن تکثیرشده hCGβ (محصول PCR تخلیص‌شده) در ناقل T همسانه‌سازی شد. فرآیند اتصال زیرواحد بتای hCG به ناقل pTz57R/T با کیت TA cloning (شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) انجام گردید. فرایند ترانسفورماسیون با استفاده از محیط آگار در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی انجام گرفت. ۲۲ کلونی ظاهر شد که از این بین ۱۲ کلونی به‌همراه دو کلونی از کنترل فرایند ترانسفورماسیون که حاوی پلاسمید pTz57R/T بود، کشت شطرنجی شد. از کلونی‌هایی که PCR آن‌ها مثبت بود تعداد چهار کلونی جهت تخلیص پلاسمید در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و توسط کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت آلمانی Roche تخلیص پلاسمید صورت گرفت.

آنالیز آنزیمی پلاسمید نوترکیب تخلیص‌شده به‌وسیله دو آنزیم XhoI و HindIII به‌طور همزمان و با بافر مشترک آن‌ها انجام گرفت. محل اثر این دو آنزیم بر روی پلاسمید در دو سوی قطعه گنجانده‌شده قرار دارند. پلاسمید pTz57R/T نیز به‌عنوان کنترل هضم آنزیمی گردید. تمام کلونی‌ها اندازه مورد انتظار را نشان دادند. پلاسمیدهای نوترکیب به نام‌های hCGβpTz57R/۱،۲،۳،٤ نام‌گذاری شدند. به‌منظور همسانه سازی زیرواحد بتای hCG در ناقل بیانی pCDNA3.1+ و انتقال آن به اسپرم، آغازگرها به‌نحوی طراحی شدند که سایت‌های برشی که در ابتدا و انتهای ژن قرار می‌گیرند در محل تجمع سایت‌های آنزیمی پلاسمید در پایین دست پروموتور وجود داشته باشند. در این پژوهش، سایت‌های آنزیم XhoI و HindIII به‌ترتیب در ابتدا و انتهای ژن بتا به‌صورتی قرار داده شد که بتوان ژن را در پلاسمید pCDNA3.1+ همسانه‌سازی کرد. از آن‌جایی‌که دو آنزیم فوق بافر مشترکی دارند پلاسمید و ژن موردنظر، با دو آنزیم و بافر جدا شدند. محصول هضم‌شده به‌وسیله کیت High Pure PCR Product Purification، تخلیص و در ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد. سایر مراحل همسانه‌سازی از جمله ترانسفورماسیون، کلونی PCR و آنالیز آنزیمی همانند حالت قبلی انجام شد و درنهایت کل نمونه‌ها بر روی ژلیک درصد الکتروفورز شد که تمام کلونی‌ها اندازه مورد انتظار را نشان دادند و درآخر پلاسمیدهای نوترکیب به نام‌های pCDNA3.1+/hCGβ۱،۲،۳،٤ نام‌گذاری شدند.

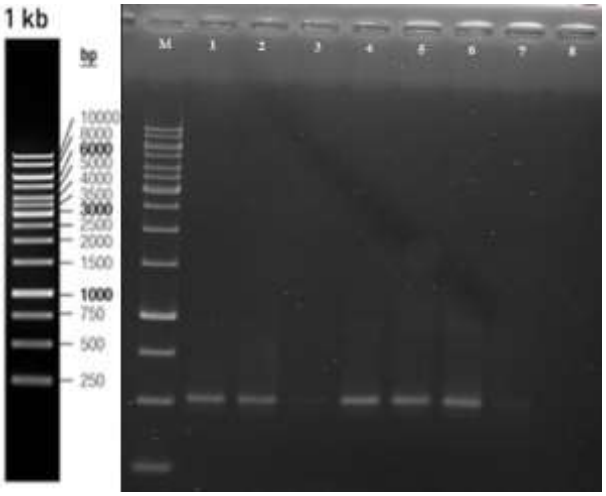
پس از دو مرحله همسانه‌سازی، از پلاسمیدهایی که در آنالیز آنزیمی الگوی صحیحی را نشان دادند برای تعیین توالی به شرکت FAZA Biotech (فزا پژوه) ارسال گردید و سپس نتیجه تعیین توالی با ژن‌های گزارش‌شده در بانک ژن مقایسه شدند و در نهایت پلاسمیدهای نوترکیب جهت انجام فرایند انتقال ژن از طریق اسپرم خروس مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

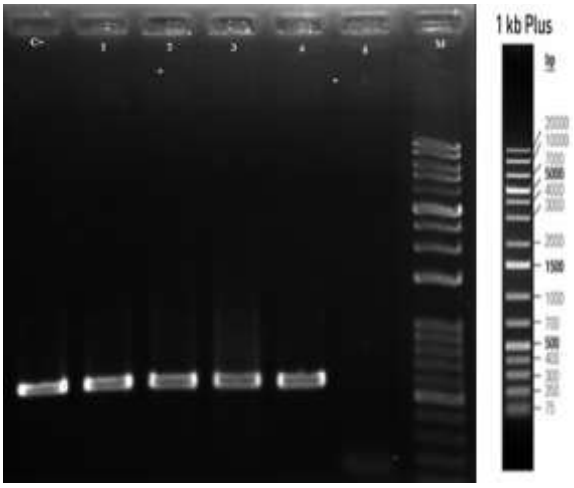
شکل۱ جداسازی و تکثیر قطعه ژنی موردنظر در این پژوهش یعنی ژن زیرواحد بتا با استفاده از واکنش PCR را نشان می‌دهد.

محصول خالص‌شده پس ازهضم به‌وسیله آنزیم‌های XhoI و HindIII در ناقل T وارد گردید و در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی در محیط کشت ترانسفورماسیون گردید. از کلونی‌های موجود پس از کشت شطرنجی، کلونی PCR انجام گرفت.

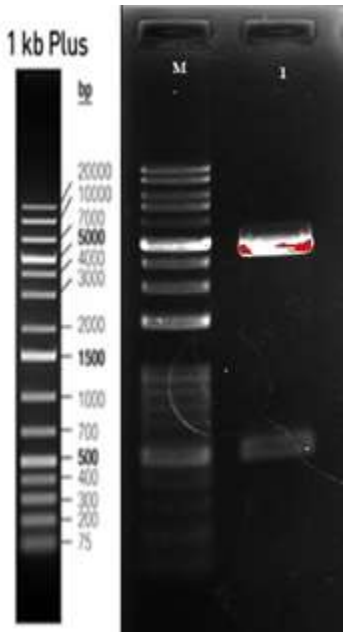
از کلونی‌هایی که نتایج PCR آن‌ها مثبت بود، سه کلونی انتخاب و در پنج سی‌سی محیط کشت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شبانه کشت شدند. نمونه‌ها پس از رسوب‌گیری توسط کیت High Pure Plasmid Isolation تخلیص پلاسمید انجام شد و یک میکرولیتر از آن‌ها بر روی ژل یک درصد بارگذاری شد که نتیجه حاکی از صحت کار تخلیص می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۱. جداسازی و تکثیر قطعه ژنی (واکنش PCR برای جداسازی ژن زیرواحد بتا ستون ۱: در دمای ٦٠، ستون ۲: در دمای ٦١، ستون ۳: در دمای ٦٢، ستون ٤: در دمای ٦٣، ستون ٥: در دمای ٦٤، ستون ٦: در دمای ٦٥، ستون ۷: در دمای ٦٦، ستون ۸: کنترل منفی واکنش PCR و ستون M: مارکر 1kb)

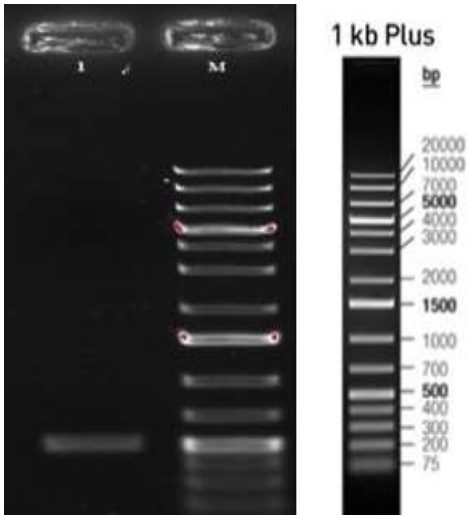


شکل ۲. واکنش کلونی PCR (ستون+C: کنترل مثبت واکنش PCR، ستون‌های ۱ تا ٤: کلونی‌های مثبت (مربوط به بتا hCG هستند و تأییدکننده حضور سازه نوترکیب pTz57R/T/hCGβ هستند، ستون ٥: کنترل منفی و ستون M: مارکر 1kb Plus)



شکل ۳. تخلیص پلاسمید با کیت High Pure Plasmid Isolation

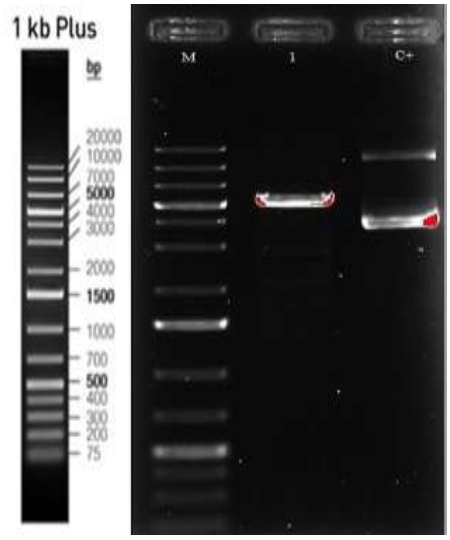
(ستون‌های ۲، ۳ و ٤: پلاسمید استخراج‌شده و ستون M: مارکر1kb Plus)



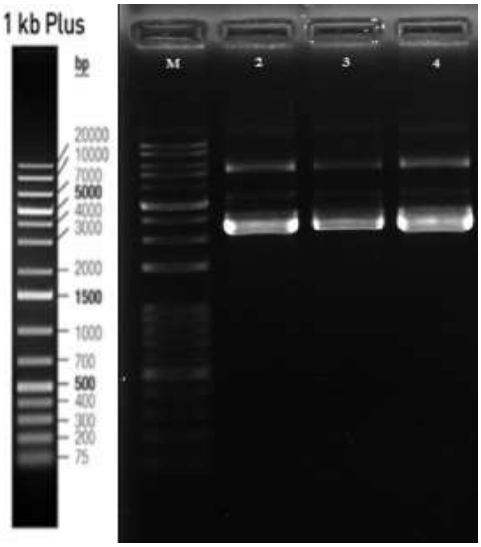
شکل ٤. هضم آنزیمی وکتور نوترکیب hCGβpTz57R/T

(ستون ۱: وکتور جداشده و قطعه ژن و ستون M: مارکر 1kb Plus)

در مرحله بعد بر روی یک نمونه با آنزیم‌های XhoI و HindIII تجزیه آنزیمی انجام شد (شکل ٤). در این مرحله قطعه ژن موردنظر با موفقیت در ناقل T همسانه‌سازی‌شده و دارای جایگاه نشست برای آنزیم‌های برشی می‌باشد. به‌همین منظور برای خارج کردن قطعه ژن موردنظر باید محصول هضم آنزیمی از روی ژل پس از بارگذاری شدن استخراج شود که نتایج آن در شکل ۵ آمده است.

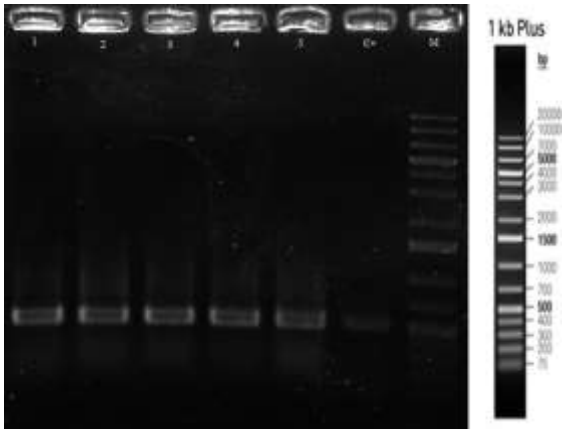


شکل ۵. محصول استخراج اسید نوکلئیک از ژل (ستون ۱: استخراج اسید نوکلئیک از ژل و ستون M: مارکر 1kb Plus)

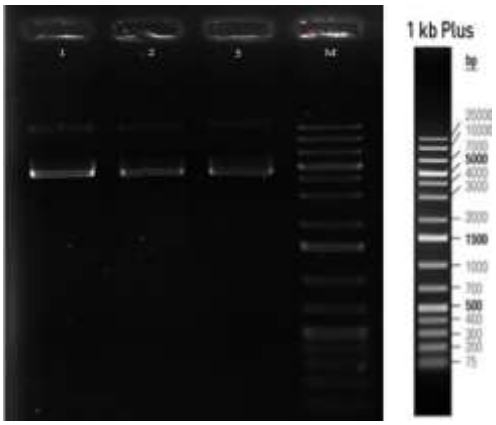


شکل ٦. هضم آنزیمی ناقل pCDNA3.1+ (ستون C+: ناقل حلقوی هضم‌نشده، ستون ۱: وکتور هضم‌شده و ستون M: مارکر 1kb Plus)

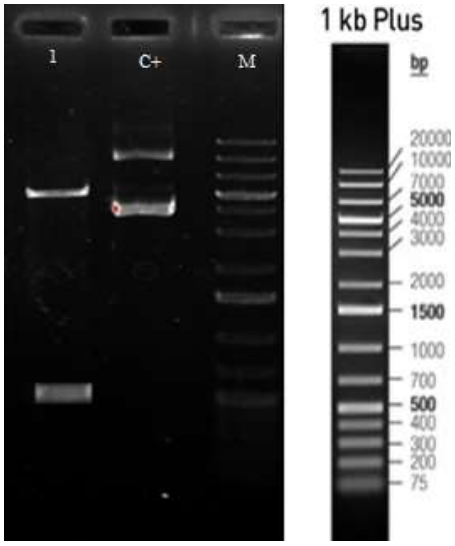
پس از استخراج و خالص‌سازی قطعه ژن زنجیره بتا از ناقل T، این قطعه در ناقل بیانی اصلی یعنی pCDNA3.1+ همسانه‌سازی شد که نتایج حاصل از هضم آنزیمی ناقل بیانی به‌وسیله دو آنزیم برشی XhoI و HindIII برای ورود قطعه ژن به آن در شکل ٦، کلونی PCR از پنج کلونی مثبت در شکل ۷، استخراج پلاسمید از سه کلونی تأییدشده پس از کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شکل ۸ و آنالیز آنزیمی محصول استخراج به‌وسیله آنزیم‌های XhoI و HindIII جهت تأیید جدا شدن موفقیت‌آمیز قطعه از ناقل انجام گرفت (شکل ۹).



شکل ۷. کلونی PCR از پنج کلونی مثبت (ستون‌های ۱ تا ۵: کلونی‌های مثبت (مربوط به بتا hCG هستند و تأییدکننده حضور سازه نوترکیب hCGβ/ pCDNA3.1+ هستند)، ستون C+: کنترل مثبت واکنش PCR و ستون M: مارکر 1kb Plus)



شکل ۸. استخراج پلاسمید از کلونی‌های مثبت hCGβ/ pCDNA3.1+ (ستون‌های ۱تا ۳: پلاسمید استخراج‌شده و ستون M: مارک 1kb Plus)



شکل ۹. هضم آنزیمی سازه نو ترکیب hCGβ/ pCDNA3.1+ (ستون C+: سازه هضم‌نشده، ستون ۱: وکتور جداشده و قطعه ژن و ستون M: مارکر 1kb Plus)

پس از دو مرحله همسانه‌سازی و انجام هضم آنزیمی و به‌منظور اطمینان از نوترکیب بودن پلاسمیدها، نمونه موردنظر برای تعیین توالی به شرکت FAZA Biotech فرستاده شد. تعیین توالی برای کلونی موردنظر به‌وسیله آغازگرهای طراحی‌شده برای زیرواحد بتا و با دوبار خوانش (یک خوانش با پرایمرF و دیگری با R) انجام گرفت. نتایج نشان داد که هیچ‌گونه جهشی در کلونی‌های مربوطه رخ نداده است. ازآن‌جایی‌که تعیین توالی از روی پلاسمید قبل از ناحیه همسانه‌سازی شدن ژن است، فریم بودن ژن با پلاسمید و صحت توالی Kozak نیز تأیید گردید.

یکی از اهداف مهندسی ژنتیک تولید پروتئین‌های نوترکیب است، درنتیجه انتخاب روش انتقال ژن و نیز میزبان بسیار مهم است. لزوم استفاده از حیوانات تراریخت برای سنتز پروتین‌های درمانی از حدود ۲۰ سال پیش مطرح شده است. در این سال‌ها چندین روش برای تولید حیوانات تراریخته توسعه یافته‌اند. در میان روش‌های گوناگون در حال حاضر سه روش به‌طور گسترده برای تولید پستانداران تراریخت به‌کار می‌رود که هر یک دارای معایب و مزایایی هستند [۲]، که شامل تزریق پیش هسته‌ای، انتقال هسته سلول سوماتیک و انتقال با استفاده از رتروویروس‌ها می‌باشند [۱۳]. ظاهر تیره سیتوپلاسم تخمک حیوانات که تزریق دقیق به داخل پیش‌هسته را بسیار دشوار می‌نماید، استفاده از تکنیک‌های ذکرشده را محدود نموده و بازدهی آنها برای تولید حیوانات تراریخت در تحقیقات متعدد کمتر از یک درصد گزارش شده است [٦و٧]. علاوه بر آن نرخ بالای بیان موزائیکی ژن خارجی از دیگر عوامل محدودکننده در استفاده از این روش برای تولید حیوانات تراریخت بوده است [۱].

تکنیک انتقال هسته سلول سوماتیک شامل انتقال هسته از یک سلول‌دهنده به یک سلول گیرنده است که به‌طور معمول سلول گیرنده یک تخمک بالغ است که محتوای ژنتیکی آن حذف شده است. پس از انتقال هسته از سلول دهنده به سیتوپلاسم سلول گیرنده (تخمک)، می‌بایست فعال‌سازی تخمک جهت شروع مراحل جنینی، به‌صورت مصنوعی انجام شود [۸]. کاربرد ناقل‌های رتروویروسی در ایجاد موجودات تراریخته به چرخه زندگی خود ویروس مربوط می‌شود. ذره رتروویروسی که حاوی پوششی از نوع وزیکول پیکر ویروس می‌باشد در مرحله‌ای که غشای هسته اووسیت حذف شده است به ناحیه بین زوناپلوسیدا و غشای اووسیت تزریق می‌شود. این روش بازدهی بالایی دارد، اما خطر ایجاد عفونت ویروسی و خاموش شدن ژن از مشکلات آن به‌شمار می‌رود که استفاده از این روش را محدود ساخته است [۹].

روش معرفی DNA خارجی به اسپرم قبل از فرآیند لقاح می‌تواند یک روش جایگزین و با صرفه اقتصادی

باشد. با توجه به گزارش‌هایی که در این زمینه وجود دارد چنین به‌نظر می‌رسد که عوامل بسیار زیادی وجود دارد که بر میزان و نوع انتقال ژن خارجی به داخل اسپرم تأثیر می‌گذارد. بنابراین مطالعات بیشتر به منظور بررسی این عوامل درکاربرد فناوری انتقال ژن از طریق اسپرم به‌عنوان یک روش مؤثر و کارا در ایجاد حیوانات مزرعه‌ای تراریخته لازم بوده و از اهمیت زیادی برخوردار است. گونه‌های پرندگان به‌خصوص مرغ به‌طور گسترده‌ای به‌دلیل مزایای ذاتی خود همچون تولیدمثل کوتاه‌مدت، تولید اسپرم با غلظت بالا و کاربردهای بالقوه آن به‌عنوان راکتورهای زیستی تراریخته برای تولید پروتئین‌های هترولوگوس مورد توجه قرار گرفته‌اند. پلاسمید نوترکیب ساخته‌شده در این مطالعه، قسمت اصلی هورمون hCG یعنی زنجیره بتا می‌باشد که قادر است با پلاسمید نوترکیب حاوی زنجیره آلفا هر یک از هورمون‌های گلیکوپروتئینی غده هیپوفیز تشکیل یک واحد αβ دهد و در تولید هورمون کامل به‌کار آید [۱۱ و ۱٤]. لذا انتقال ناقل بیانی مناسب در پژوهش‌های تراریخت بسیار تأثیرگذار می‌باشد که در این پژوهش، وکتور بیانی PcDNA3.1+ انتخاب گردید. بنابراین ابتدا ژن موردنظر توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد و در دو انتهای ژن سنتزشده سایت برش آنزیمی XhoI و HindIII افزوده شد. در دو طرف ژن به‌کمک پرایمر محلی برای اثر این دو آنزیم و توالی Kozak بازسازی شد. توالی Kozak یک توالی نوکلئوتیدی (GCTATGG) روی مولکول mRNA ایجاد می‌کند که نقش عمده‌ای در شروع بیان ژن در سلول های یوکاریوت دارد [۱۲]. پس از تکثیر ژن توسط فرایند همسانه‌سازی در باکتری DH5α، این ژن توسط آنزیم‌های XhoI و HindIII هضم آنزیمی گردید و از پلاسمید PBHA استخراج شد. پس از خالص‌سازی ژن از ژل، هم‌زمان وکتور بیانی pcDNA3.1+ توسط آنزیم‌های XhoI و HindIII هضم آنزیمی و سپس تخلیص شد. پس از همسانه‌سازی سازه نوترکیب PcDNA3.1+/βhCG صحت پلاسمیدهای خالص‌شده به دو روش هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. نتایج همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی این مطالعه با پژوهشی که ژن hCG نوترکیب در سلول‌های تخمدان همستر چینی همسانه‌سازی شد، مطابقت دارد [۱۰]. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، به‌نظر می‌رسد که همسانه‌سازی زیرواحد بتای هورمون گونادوتروپین جفت انسانی به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است و پلاسمید نوترکیب حاوی این ژن ساختار مناسبی برای انتقال به اسپرم خروس دارد که می‌تواند در تولید جوجه‌های تراریخت به‌کار گرفته شود.

منابع

1. Collares T, Campos VF, de Leon PMM, Cavalcanti PV, Amaral MG, Odir A, Dellagostin, JCD, and Fabiana K (2011) Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N, N-dimethylacetamide. Journal of Biosciences, 36(4): 613-620.
2. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Karl ME, Richard DP, and Ralph LB. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs bymicroinjection. Nature, 315(6021): 680-683.
3. [3]. Houdebine LM (2007) Transgenic animal models in biomedical research. Target Discovery and Validation Reviews and Protocols: Volume 1, Emerging Strategies for Targets and Biomarker Discovery, 163-202.
4. Iles RK (2007) Ectopic hCGβ expression by epithelial cancer: malignant behaviour, metastasis and inhibition of tumor cell apoptosis. Molecular and Cellular Endocrinology, 26(0): 264-270.
5. Ind T, Iles R, Shepherd J and Chard T (1997) Serum concentrations of cancer antigen 125, placental alkaline phosphatase, cancer-associated serum antigen and free beta human chorionic gonadotrophin as prognostic markers for epithelialovarian cancer. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 104(9): 1024-1029.

6. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, and Corrado S (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell, 57(5): 717-723.
7. Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, et al. (1997) The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. Experimental Cell Research, 233(1): 56-62.
8. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell K, Colman nA, Schnieke et al. (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature, 405(6790):1066-1069.
9. Mozdziak PE and Petitte JN (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. Developmental Dynamics, 229(3): 414-421.
10. Romanov MN (2007) Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. Journal of Heredity, 98(1): 97-98.
11. Shoham Z, Mannaerts B, Insler V and Bennink HJC (1998) Induction of follicular growth using recombinant human follicle-stimulating hormone in two volunteer women with hypogonadotropic hypogonadism. Fertility and Sterility, 69(2): 10S-14S.
12. Sugahara T, Grootenhuis PD, Sato A, Kudo M, Ben-Menahem D, Mary RP, Aaron JW and Irving B (1996) Expression of biologically active fusion genes encoding the common α subunit and either the CGβ or FSHβ subunits: role of a linker sequence. Molecular and Cellular Endocrinology, 125(1): 71-77.
13. Wall R (2002) New gene transfer methods. Theriogenology, 57(1): 189-201.
14. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Münstedt K, Klaus T (2002) Characterization of human chorionic gonadotropinas a novel angiogenic factor. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87(11): 5290-5296.

Animal Production
(*College of Abouraihan – University of Tehran*)

Vol. 20 ■ No. 2 ■ Summer 2018

Cloning of human chorionic gonadotropin beta subunit for rooster sperm mediated gene transfer

Mahdi Noorani[1], Shaban Rahimi[2*], Abdolhossein Shahverdi[3], and Mohsen Sharafi[4]

1. M.Sc. Student, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Received: June 27, 2016 Accepted: May 17, 2018

Abstract

The aim of this study was cloning of the beta subunit of human chorionic gonadotropin in an appropriate vector for production of transgenic chicken trrough sperm mediated gene transfer. In this regard, transgenic chicken production tecnology has taken into consideration for having many advantages such as short generation interval, the large number of production of offspring and suitable pattern of protein glycosylation. To date, no study has been conducted on the cloning of the beta subunit of human chorionic gonadotropin for rooster sperm. For this purpose, the hormone beta subunit were amplified by a specific primer pairs, and cloned in T vector. The recombinant plasmid was transformed into Competent *E. coli* cells and colonies that containing recombinant plasmids were selected by colony PCR.The validity of extracted plasmid were analyzed by enzyme digestion and sequencing. The beta chain of T vector was isolated and was cloned again into pcDNA3.1 + expression vector. The results of enzyme analysis and sequencing indicated that recombinant plasmid pCDNA3.1 +/βhCG were cloned with the correct sequence and completely matched up with human chorionic gonadotropin beta subunit gene that can be concluded that it has sutible structure for sperm mediated gene transfer.

Keywords: Plasmid, sperm, sequencing, transgenic chickens.

Corresponding author: rahimi_s@modares.ac.ir