Vol 26, No. 2, Summer 2024

University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

Knockout of myostatin (MSTN) gene using CRISPR/Cas9 technology in order to produce knockout Varamini sheep embryos

Maryam Bazgiri[1] | **Jamal Fayazi**[2]✉ | **Mohammad Salehi**[3,4]✉ | **Vahid Jajarmi**[5]

1. Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: m_bazgiri_1989@asnrukh.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: j_fayazi@asnrukh.ac.ir
3. Corresponding Author, Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: m.salehi@sbmu.ac.ir
4. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: m.salehi@sbmu.ac.ir
5. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: s.jajarmi@sbmu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 26 December 2023
Received in revised form
12 June 2024
Accepted 12 June 2024
Published online 14 July 2024

Keywords:
CRISPR/Cas9
Gene editing
MSTN
Muscle
Varamini sheep

ABSTRACT

Introduction: Myostatin (MSTN) is a member of transforming growth factor-β (TGF-β), which is a negative regulator for muscle differentiation and growth in various mammals and plays a key role in muscle growth and meat quality. Today, CRISPR technology can be used to accurately change any attribute. The CRISPR/Cas9 technology creates double-strand breaks (DSBs) in the target region of DNA, which can be repaired by homology repair (HDR) in the presence of the corresponding homologous repair template or by non-homologous end joining (NHEJ).

Materials and Methods: Guide RNAs (sgRNA) were designed using CRISPOR online software. Eggs collected from 150 Varami sheep were placed in 50-microliter drops of culture medium in an incubator containing 7% CO_2 and 95% humidity. 22-24 hours after IVM, a mixture of two guide RNAs cloned in a CRISPR vector was injected into each oocyte at a concentration of 30 ng with a microinjection microscope. After microinjection, the parthenogenesis method was used to fertilize the eggs. After the activation of the eggs in the wells of the 96-well plate, the bottom of which was covered with cumulus cells and sage medium for eight days in an incubator with a temperature of 38.5 degrees Celsius and 7% CO_2gas, they were cultivated under conditions of maximum humidity. After eight days, the zygotes that had reached the embryonic stage were analyzed with a fluorescent microscope. The embryos of the test group that emitted green light, as well as one embryo from the control group, were individually placed in nine microliters of DNA Lysis to prepare their genomes. They were incubated in a temperature program of one hour at 65 degrees and ten minutes at 90 degrees. In order to investigate the gene editing of the embryos that emitted green light, the PCR products of five greened embryos along with one embryo of the control group were sequenced by the trench method.

Results and Discussion: Finally, 12 sheep embryos were produced, which were analyzed with a fluorescent microscope, and a total of five embryos emitted green light. The green light indicated that they had received the CRISPR/Cas9 technology. Among the five embryos, two of the embryos with guide RNA 1 showed a single nucleotide deletion upstream of PAM. Additionally, two of the embryos showed a single nucleotide deletion in guide RNA 2, while one of the embryos remained unchanged. Sequence analysis of the knockout embryos revealed that 83% of the cells were cut. After creating two types of single nucleotide deletions in different positions of sheep embryos, the effect of this genomic editing was detected by examining the amino acid sequence of the embryos in the control group and those carrying the mutation. It was observed that the deletion of a single nucleotide caused by guide RNA resulted in a change in the genome framework and termination code, leading to a shorter amino acid sequence in the edited sheep compared to the control group. This research marked the first time that laboratory embryos of Varamin sheep genetically manipulated by CRISPR/Cas9 technology were produced.

Conclusion: The nucleotide sequence of MSTN gene in Varami sheep was different from the sequence recorded in NCBI. Five embryos showed CRISPR technology markers. Both of the designed guide RNAs caused mutations in the nucleotide sequence and termination code in the amino acid sequence.

Cite this article: Bazgiri, M., Fayazi, J., Salehi, M., & Jajarmi, V. (2024). Knockout of myostatin (MSTN) gene using CRISPR/Cas9 technology in order to produce knockout Varamini sheep embryos. *Journal of Animal Production*, 26 (2), 99-110. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.370186.623774

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.370186.623774

دوره بیست و ششم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۳

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲-۹۹۴x

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

ناک‌اوت ژن میوستاتین با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 به‌منظور تولید رویان گوسفند ورامینی ناک‌اوت‌شده

مریم بازگیری[۱] | جمال فیاضی[۲]✉ | محمد صالحی[۳و۴]✉ | وحید جاجرمی[۵]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: m_bazgiri_1989@asnrukh.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: j_fayazi@asnrukh.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: m.salehi@sbmu.ac.ir

۴. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: m.salehi@sbmu.ac.ir

۵. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: s.jajarmi@sbmu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

کلیدواژه‌ها:

گوسفند ورامینی

ماهیچه

میوستاتین

ویرایش ژنی

CRISPR/Cas9

چکیده

ژن میوستاتین (MSTN)) نقش مهمی در تنظیم توده عضلانی اسکلتی ایفا می‌کند و مهار ترجمه‌ای این ژن نشان‌دهنده افزایش توده عضلانی است که به‌عنوان "فنوتیپ دو ماهیچه‌ای" شناخته می‌شود. اختلال در بیان ژن MSTN با استفاده از تکنولوژی ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 رشد عضلانی و نرخ رشد را در گونه‌های دام از جمله گوسفند و بز نشان داده است. این پژوهش به‌منظور تولید رویان‌های گوسفند ورامینی حامل ژن MSTN ناک‌اوت شده و بررسی این رویان‌ها انجام شد. در مرحله اول، برای طراحی و انتخاب RNA راهنما از نرم‌افزار CRISPOR (http://crispor.tefor.net/) برای غربالگری اولیه استفاده شد. دو RNA راهنما که اگزون یک ژن MSTN را هدف قرار می‌دهند انتخاب شدند. سپس به میزان ۵۰ نانوگرم از مخلوط دو RNA راهنما به‌همراه Cas9 mRNA به‌صورت هم‌زمان به تخمک‌ها ریز تزریق شد. از بین ۱۲ رویان تولیدشده پنج رویان مارکر تکنولوژی CRISPR را نشان دادند. نتایج توالی‌یابی نشان داد دو نوع جهش برای RNA راهنما یک و RNA راهنما دو به‌صورت جداگانه یافت شد، اما هر دو نوع از RNA راهنماها به‌صورت هم زمان در هیچ‌یک از رویان‌ها عملکرد نداشتند. درصد برش سلول با سایت Synthego، ۸۳ درصد گزارش شد. توالی نوکلئوتیدی اگزون یک MSTN ثبت‌شده در NCBI با توالی گوسفند ورامینی متفاوت بود. براساس نتایج حاصل، بعد از جهش ایجاد شده در ژن MSTN با سیستم CRISPR/Cas9 توالی اسیدآمینه‌ای رویان‌های ناک‌اوت شده ژن MSTN در مقایسه با توالی اسد آمینه‌ای گروه کنترل کد خاتمه را نشان دادند.

استناد: بازگیری، مریم؛ فیاضی، جمال؛ صالحی، محمد و جاجرمی، وحید (۱۴۰۳). ناک‌اوت ژن میوستاتین با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 به‌منظور تولید رویان گوسفند ورامینی ناک‌اوت‌شده. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۶ (۲)، ۱۱۰-۹۹. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.370186.623774

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

۱. مقدمه

کارایی اقتصادی و بیولوژیکی صنایع پرورش گوسفند به‌طورکلی با افزایش بهره‌وری و عملکرد تولیدمثلی میش‌ها بهبود می‌یابد (Ahsani *et al.*, 2010). بیست و شش نژاد گوسفند در ایران پرورش داده می‌شوند که شامل بیش از ۵۰ میلیون رأس هستند (Mohammadabadi *et al.*, 2023) که هر کدام از آن‌ها با بخش خاصی از کشور سازگار شده‌اند (Safaei *et al.*, 2022). گوسفند به‌عنوان نشخوارکننده کوچک نقش مهمی در تولیدات کشاورزی و گذراندن زندگی مردم دارد (Amiri Roudbar *et al.*, 2018). بهبود تولید گوشت یکی از اهداف نهایی اصلاح نژاد دام است و انتظار می‌رود با توجه به افزایش روزافزون جمعیت انسان، تقاضا برای محصولات حیوانی تا سال ۲۰۵۰ بیش از ۷۰ درصد افزایش یابد. توانایی به‌کارگیری مهندسی ژنوم در حیوانات مزرعه از اهمیت زیادی در زمینه‌های کشاورزی، داروسازی، دامپزشکی و تحقیقات زیست‌پزشکی برخوردار است. گوسفند و بز حیوانات بزرگی هستند که برای استفاده در کاربردهای بیوتکنولوژیکی مانند اصلاح ژنتیکی مناسب هستند. مناسب‌بودن آن‌ها به دلیل (i) اندازه آن‌ها است، به این معنی که گله‌های آزمایشی را می‌توان به‌راحتی و بادقت در مقایسه با حیوانات بزرگ‌تر (مانند گاو) مدیریت کرد (Kalds *et al.*, 2020).

ژن MSTN توسط پژوهش‌گران به‌عنوان ژن کاندیدا برای تولید گوشت در نژادهای مختلف حیوانات مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. جهش در MSTN یک فنوتیپ ماهیچه‌ای مضاعف ایجاد می کند که آن را از نظر تجاری برای بهبود تولید گوشت دام و ارائه پروتئین با کیفیت بالا برای انسان ارزشمند می‌کند (Chen *et al.*, 2023). MSTN عضوی از فاکتور رشد تبدیل‌کننده (TGF-β) β است که تنظیم‌کننده منفی برای تمایز و رشد عضلانی در پستانداران مختلف است (Aiello *et al.*, 2018) و نقش کلیدی در رشد عضله و کیفیت گوشت دارد (McPherron & Lee, 2002). MSTN پس از این‌که به‌صورت پیش‌ساز در عضلهٔ اسکلتی سنتز شد، دو فرایند پروتئولیتیکی را طی می‌کند و به‌صورت یک پروتئین همودایمر ۲۶ کیلودالتونی خاموش به گردش خون ترشح می‌شود. در شرایط فعال‌سازی، میوستاتین به گیرندهٔ خود در سطح سلول، اکتیوین نوع IIB متصل شده که به فعال‌سازی پروتئین‌های p21 (مهارکنندهٔ سایکلین‌های چرخهٔ سلولی) و Smad (مولکول‌های القاکنندهٔ پیام‌های درون سلولی به جریان‌های پایین‌دست) منجر می‌شود. p21 از طریق مهار Cdk2[1] و از اینرو هیپوفسفوریلاسیون موجب مهار تکثیر سلول‌های اقماری[2] می‌شود و از طرفی smad3 فعالیت نسخه‌برداری فاکتورهای تنظیمی میوژنیک از جمله میوژنین را که در تمایز سلول‌های اقماری نقش کلیدی دارد، مهار می‌کند. بنابراین هدف اصلی پیام‌رسانی MSTN سرکوب تکثیر و تمایز سلول‌های اقماری و در نهایت مهار رشد عضله است (Kraemer & Ratamess, 2005).

۲. پیشینه پژوهش

MSTN پستانداران بسیار حفاظت شده است و جهش در ژن MSTN، چه به‌صورت مصنوعی یا طبیعی، منجر به افزایش وزن اسکلتی و تولید یک فنوتیپ "ماهیچه مضاعف" می‌شود که در بسیاری از گونه‌ها از جمله گاو، گوسفند و خوک، خرگوش و انسان گزارش شده است (Dilger *et al.*, 2010). با این‌حال، جهش‌ها در مکان‌های مختلف MSTN اغلب فنوتیپ‌های مختلفی را تولید می‌کنند و مکانیسم مولکولی آن برای رشد و توسعه ماهیچه‌های اسکلتی بحث برانگیز باقی می‌ماند (Wegner *et al.*, 2000).

در چند دهه اخیر، پیشرفت علمی و فناوری بی‌سابقه‌ای برای ویرایش ژنوم بسیاری از گونه‌ها تا سطح جایگزینی

1. Cyclin-dependent kinase 2
2. Satellite cells

تک‌نوکلئوتیدی با سهولت و دقت بیش‌تر حاصل شده است (Mali *et al.*, 2013). استفاده از ویرایش ژنوم در اصلاح نژاد حیوانات، محققان را قادر ساخته که دست خود را به‌طور مستقیم روی توالی‌های ژنومی قرار داده و آن‌ها را ویرایش کنند تا در مدت‌زمان بسیار کوتاهی بادقت بی‌سابقه‌ای به آرزوهای دیرینه پرورش حیوانات دست یابند.

تکنیک CRISPR/Cas9 را می‌توان جهت حذف و اضافه‌های کوچک ژنومی، حذف یا بازارایی‌های بزرگ (شامل واژگونی یا جابجایی)، فعال‌سازی ژن، تنظیم بیان ژن با تغییر آرایش هیستون‌ها یا متیلاسیون DNA و تعیین مکان ژنومی یک لوکوس خاص با استفاده از پروتئین‌های فلورسنت مورد استفاده قرار داد (M Scharenberg *et al.*, 2013). امروزه از تکنولوژی CRISPR می‌توان برای تغییرات در هر صفتی به‌طور دقیق استفاده نمود. Cas9 یک ویرایشگر ژنوم کارآمد و دقیق است (Chebo *et al.*, 2022) و به‌طور گسترده برای تولید حیوانات سالم تر و مولدتر مزرعه استفاده شده است (Kalds *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022). ریز تزریق Cas9 mRNA و RNA راهنما به رویان، جهش‌های تغییر چارچوب را در مکان‌های هدف ایجاد می‌کند. تکنولوژی CRISPR/Cas9 شکستگی‌های دو رشته‌ای (DSBs) را در ناحیه هدف DNA ایجاد می‌کند که می‌تواند توسط تعمیر همسانی (HDR) در حضور الگوی تعمیر همولوگ مربوطه یا با اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) ترمیم شود. فرآیند ترمیم NHEJ مستعد خطا است و درج یا حذف نوکلئوتیدی ایجاد می‌کند که منجر به جهش‌های تغییر چهارچوب ژنوم می‌شود که ژن هدف را غیرفعال می‌کند (Vilarino *et al.*, 2018). با این‌حال، حیواناتی که با این روش تولید می‌شوند، موزائیسم عملکردی ژن را نشان می‌دهند (Kalds *et al.*, 2020). یک یا دو نسل برای تولید حیوانات ویرایش شده هتروزیگوت یا هموزیگوت برای ارزیابی صفت موردنیاز است. با این‌حال، فواصل نسل در حیوانات مزرعه همیشه طولانی است و تلاقی برای تولید افراد هموزیگوت کار دشواری است (Guo *et al.*, 2023). در مقایسه با سایر تکنیک‌ها، این تکنولوژی دارای مزایای بازده برش بالا (تا ۸۰ درصد)، هزینه کم و سهولت در کار است. بنابراین، به‌طور گسترده در انواع مختلف ویرایش ژن، از جمله ناک اوت ژن، ناک اوت جایگاه هدف، و ناک اوت هم‌زمان چندین جایگاه استفاده می‌شود (Zhang *et al.*, 2019). بنابراین، ژن MSTN را می‌توان به‌عنوان یک هدف ویرایش ژنومی به‌منظور تولید حیوانات اصلاح‌شده ژنتیکی با افزایش توده عضلانی در نظر گرفت (Crispo *et al.*, 2015). با توجه به اهمیت ماهیچه مضاعف در افزایش گوشت تولیدی گوسفند و نیز ظهور تکنولوژی CRISPR، آزمایش حاضر در جهت طراحی وکتور CRISPR/Cas9 و بهینه‌سازی آن به‌منظور ویرایش ژن MSTN برای اولین بار در گوسفندان ورامینی طراحی گردیده است.

۳. روش‌شناسی پژوهش

طراحی سامانه CRISPR/Cas9 اختصاصی: در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی، یک سامانه ویرایش ژنی تخصصی با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 طراحی شد تا بخشی از اگزون شماره یک ژن MSTN از رویان گوسفند حذف گردد. به این منظور، RNA راهنما (sgRNA) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (http://crispor.tefor.net) CRISPOR طراحی شد. توالی نوکلئوتیدی RNA راهنماها به‌ترتیب GGCGAAGCTTACTGAGGATT RNA راهنما یک و GTGGTAGTCATCGTCTTCCA RNA راهنما دو و CCN توالی PAM می‌باشد. به‌منظور تکثیر قطعه موردنظر برای ژن MSTN با اکسس‌نامبر (NC_056055) یک جفت آغازگر با توالی Primer-F: AGTGGATCTGAATGAGAACAGC و Primer-R: CCTTACGTACAAGCCAGCA طراحی گردید و برای سنتز به شرکت پیشگام ارسال شدند.

هر دو RNA راهنما به‌صورت مجزا در وکتور eSpCas9 که دارای توالی پروموتور U6 است و از Addgene تهیه شده بود کلون شدند. پروموتور U6، از نوع سوم RNA پلیمراز سه است که معمولاً برای بیان قطعات کوتاهی همچون

(shRNA) در وکتورها به‌کار می‌رود. برای برش وکتور از آنزیم BbS1 و همین‌طور برای اتصال از آنزیم DNA لیگاز T4 استفاده گردید، بنابراین دو وکتور نوترکیب تخصصی برای ویرایش ژنوم رویان گوسفند ورامینی تولید شد که در این پژوهش با نام‌های eSpCas9-sgRNA1 و eSpCas9-sgRNA2 خوانده می‌شوند. تأیید صحت وکتورهای نوترکیب حاصل با انجام PCR با آغازگرهای اختصاصی پروموتور U6 و آنتی‌سنس RNA راهنما یک برای وکتور نوترکیب eSpCas9-sgRNA1 و آغازگرهای اختصاصی پروموتور U6 و آنتی‌سنس RNA راهنما دو برای وکتور نوترکیب eSpCas9-sgRNA2 صورت گرفت. آغازگر رفت از روی پروموتور hU6 درون وکتور و آغازگر برگشت از روی ناحیهٔ مکمل RNA راهنما کلون شده طراحی گردید. در نهایت برای تأیید نهایی کلون‌شدن RNA راهنماها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شدند.

بعد از کشتار ۱۵۰ گوسفند ورامینی در کشتارگاه تهران، دستگاه تولیدمثلی آن‌ها از بدن خارج گردید. سپس تخمدان‌ها از بافت‌های نگهدارنده پیرامون جدا شده و به داخل فلاسک حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی که دمای آن بین ۳۹–۳۸ درجه تنظیم شده بود، منتقل شد. در آزمایشگاه تخمدان‌ها چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو و توده‌های سلول‌های کومولوس- تخمک (COCs) از فولیکول‌های شفاف با اندازه ۲–۸ میلی‌متر توسط سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری پیستون‌دار با سرسوزن شماره ۱۸ یک‌بارمصرف حاوی محیط آسپیراسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد آسپیره شدند. بعد از اتمام آسپیره تخمک‌ها و ته‌نشین‌شدن تمامی تخمک‌های آسپیره‌شده جستجوی تخمک‌ها، جداسازی و انتخاب آن‌ها، در زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام شد.

تخمک‌های جمع‌آوری‌شده براساس تعداد لایه سلول‌های کومولوس اطرافشان دسته‌بندی شدند؛ دسته اول تخمک‌هایی که در اطرافشان چندلایه سلولی متراکم از سلول‌های کومولوس داشتند. دسته دوم، تخمک‌هایی که دو یا سه لایه از سلول‌های کومولوس را در اطراف خود داشتند و دسته سوم، تخمک‌های فاقد سلول‌های کومولوس بودند که به‌اصطلاح تخمک‌های لخت اطلاق می‌گردند. سپس COCهای حاوی بیش از سه لایه کومولوس متراکم به‌همراه سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت بودند برای بلوغ آزمایشگاهی انتخاب شدند.

محیط کشت پایه شست‌وشو شامل TCM-Hepes، ده درصد سرم جنین گاوی و هپارین به نسبت ۶ میکرولیتر به ازای هر یک میلی‌لیتر بود. محیط کشت شامل ۹۰۰ میکرولیتر TCM ۱۹۹ به‌همراه یک میکرولیتر LH، یک میکرولیتر FSH، یک میکرولیتر بتا استرادیول، یک میکرولیتر EGF و ۱۰۰ میکرولیتر (۱۰ درصد) سرم جنین گاوی بود. تخمک‌ها درون قطره‌های ۵۰ میکرولیتری محیط کشت درون انکوباتور حاوی هفت درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد قرار گرفتند.

بعد از گذشت ۲۲–۲۴ ساعت از IVM، تخمک‌های بالغ‌شده را داخل یک پتری‌دیش حاوی قطره‌های HTCM+FBS10% و هیالورونیداز ۰/۱ درصد) به‌مدت سه دقیقه گذاشته و سپس به‌کمک موس پیپت و پیپتاژ تخمک‌ها از سلول‌های کومولوس اطراف خود جدا شدند. تخمک‌های لخت‌شده داخل پتری دیش ریز تزریق (INJECT) که حاوی قطره‌های ده میکرولیتر از HTCM که روی آن‌ها با روغن معدنی پوشانده شده است، قرار داده شدند. از مخلوط دو RNA راهنما کلون‌شده در وکتور CRISPR/Cas9 به غلظت ۳۰ نانوگرم به هر تخمک با میکروسکوپ ریز تزریق اپندورف آلمان تزریق شد. سپس، تخمک‌ها به‌مدت پنج دقیقه در محیط کشت TCM-Hepes حاوی ده درصد سرم رویانی گاوی و یونومایسین یک درصد قرار گرفتند و بعد از آن با محیط sage شست‌وشو شدند. پس از ریز تزریق، برای لقاح تخمک‌ها از روش پارتنوژنز استفاده شد بدین صورت که تخمک‌ها در محیط کشت sage حاوی دو میلی‌مولار ۶- دی متیل آمینو پورین به‌مدت سه ساعته فعال‌شدند. بعد از فعال‌شدن تخمک‌ها در چاهک‌های پلیت 96 خانه که کف آن با سلول‌های کومولوس پوشانده شده بود و محیط sage به‌مدت هشت روز در انکوباتور با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و هفت درصد گاز دی‌اکسیدکربن در شرایط حداکثر رطوبت کشت داده شدند.

بعد از هشت روز زیگوت‌هایی که به مرحله رویانی رسیده بودند با میکروسکوپ فلورسنت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و رویان‌های گروه تست که نور سبزرنگ از خود ساطع کردند و همین‌طور رویان گروه کنترل برای تهیه ژنوم آن‌ها هرکدام به‌صورت جداگانه داخل نُه میکرولیتر از DNA Lysis قرار داده شدند و در برنامه دمایی یک ساعت در دمای ۶۵ درجه و ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه در دستگاه ترموسایکلر اپندورف آلمان انکوبه شدند.

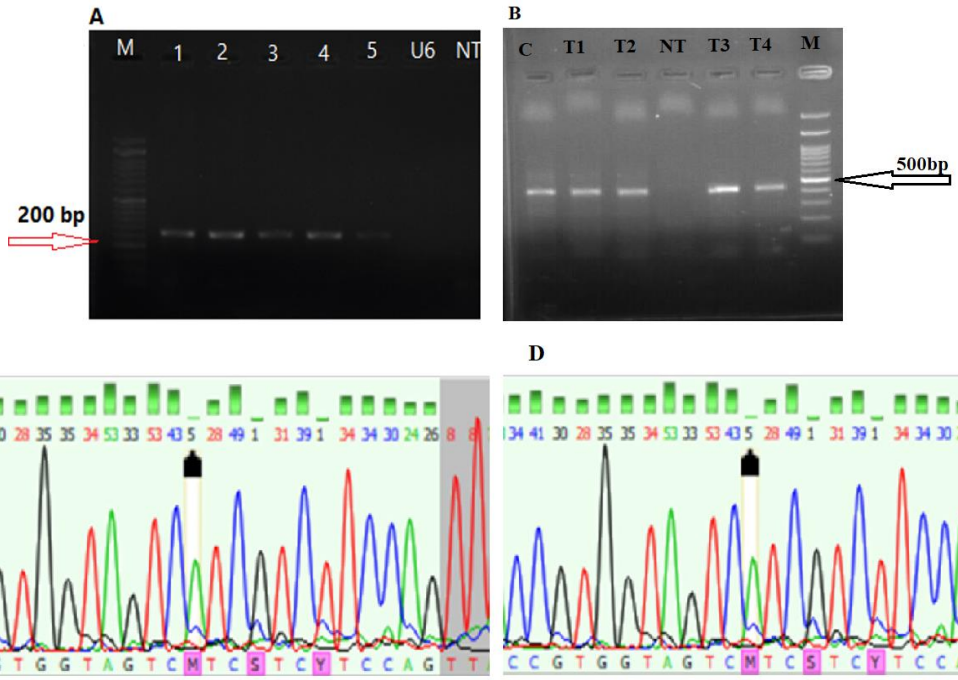
واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر، شامل بافر 2X، ۱۵۰ نانوگرم از DNA ژنومیک، پنج میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای رفت و برگشت پنج پیکو مولار و آب استریل دو بار تقطیر تا رسیدن به حجم موردنظر انجام شد. تکثیر قطعه موردنظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه به‌مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه) و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف آلمان جهت گسترش زنجیره DNA استفاده شد که محصولات PCR روی ژل آگاروز یک و نیم درصد، الکتروفورز شدند.

به‌منظور بررسی ویرایش ژنی رویان‌هایی که نور سبزرنگ از خود ساطع کرده بودند، محصول PCR پنج رویان سبزشده به‌همراه یک رویان گروه کنترل به‌روش سانگر سکانس شدند. سپس برای تشخیص ویرایش ژنومی نتایج سکانس با نرم‌افزار آنلاین MultipleSequence Alignment by CLUSTALW با آدرس https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی میزان درصد برش سلول‌ها از نرم‌افزار آنلاین Synthego (ICE CRISPR Analysis Tool) با آدرس https://ice.synthego.com استفاده شد. برای بررسی میزان تاثیر ویرایش‌های ایجادشده برروی چارچوب پروتئین MSTN از نرم‌افزار آنلاین Expasy (https://web.expasy.org/translate/) و Uniport (https://www.uniprot.org/) کمک گرفته شد.

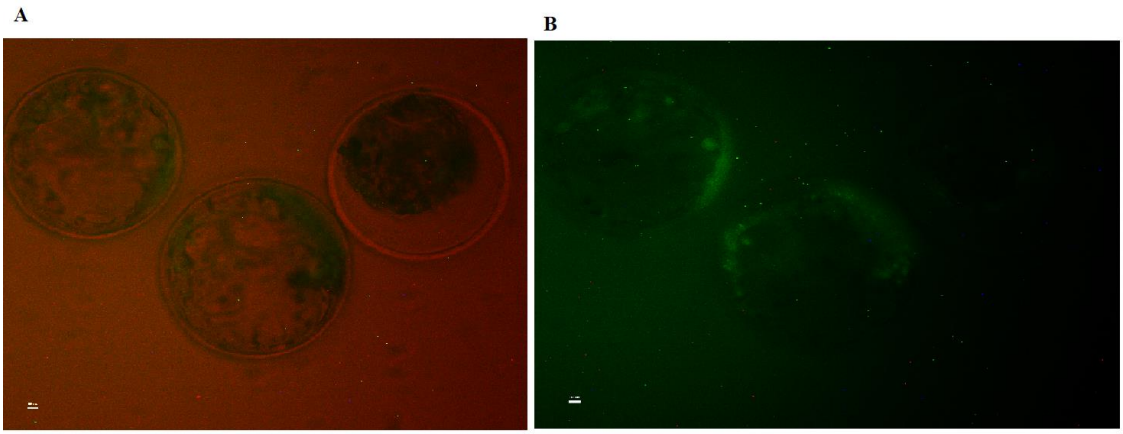
۴. یافته‌های پژوهش و بحث

پس از طراحی RNA راهنماها، توالی‌های RNA راهنما یک و RNA راهنما دو به‌صورت جداگانه در دو وکتور CRISPR/Cas9 کلون گردیدند. در نتیجهٔ کلونینگ این قطعات ژنی، دو وکتور CRISPR/Cas9 نوترکیب eSpCas9-sgRNA1 و eSpCas9-sgRNA2 ساخته شدند. با به‌کارگیری روش PCR مشخص گردید که RNA راهنما با موفقیت در محل صحیح خود در هر یک از وکتورها درج شده‌اند. محصول PCR با اندازه ۲۵۶ جفت باز نشان‌دهندهٔ حضور هر یک از RNA راهنماها در وکتور مربوطه هستند هم‌چنین نتایج سکانس نشان داد که RNA راهنما با موفقیت کلون شده‌اند (شکل ۱).

پس از تأیید کارایی تکنولوژی CRISPR/Cas9، یک سری عملیات برای تولید رویان گوسفند اصلاح‌شده با ژن انجام شد. در مجموع ۱۳۰ تخمک جمع‌آوری شد که به ۷۰ عدد از آن‌ها دو RNA راهنما به‌صورت هم‌زمان با غلظت ۳۰ نانوگرم ریز تزریق شد. در نهایت ۱۲ رویان گوسفندی تولید شد که با میکروسکوپ فلورسنت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که در مجموع پنج رویان نور سبزرنگ را تولید کردند. نور سبز نشان‌دهنده این بود که آن‌ها تکنولوژی CRISPR/Cas9 را دریافت کرده‌اند (شکل ۲). برای استخراج DNA رویان‌های سبزشده هرکدام به‌صورت جداگانه در نُه میکرولیتر بافر DNALysis گذاشته شدند و سپس در برنامه دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت و ۹۵ درجه به‌مدت ده دقیقه انکوبه شدند و بعد از آن در فریزر ۲۰– درجه قرار داده شدند.



شکل ۱. (A) باند شماره یک و دو: نتیجه کلونینگ RNA راهنما یک، باند شماره سه ، چهار و پنج نتیجه کلونینگ RNA راهنما دو، u6: PCRبا آغازگر U6 به‌تنهایی و NT کنترل منفی می‌باشد. (B) نتیجه PCR ژنومیک رویان‌های گوسفندی: (T1-T5) رویان‌های گروه تست، (C) کنترل و NT: کنترل منفی است. (C) و D نتایج سکانس کلون به‌ترتیب RNA راهنما دو و RNA راهنما یک است.

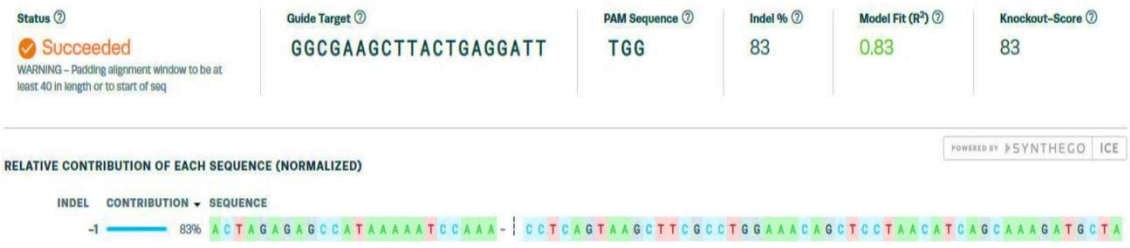


شکل ۲. (A) بلاستوسیت‌های ترنسفکت شده در نور UV. (B) رویان‌های گوسفندی که از خود نور سبزرنگ ساطع نمودند.

بعد از استخراج DNA از رویان‌ها و تکثیر اگزون یک MSTN با PCR، محصول PCR پنج رویان سبزشده به‌همراه محصول PCR یک رویان از گروه کنترل به‌روش سانگر تعیین توالی شدند. سپس توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین پنج رویان دو رویان با RNA راهنما یک حذف تک‌نوکلئوتیدی در بالادست PAM را نشان دادند. همین‌طور دو تا از رویان‌های حذف تک نوکلئوتیدی در داخل RNA راهنما دو را نشان دادند و یکی از رویان‌ها هیچ تغییری نکرده بود. همین‌طور دو تا RNA راهنما در هیچ‌کدام از رویان‌ها به‌صورت هم‌زمان عملکرد نداشتند (شکل ۳).

شکل ۳. (A) عملکرد RNA راهنما یک در پنج رویان گوسفندی را نشان می‌دهد که در رویان‌های چهار و پنج در بالادست PAM یک نوکلئوتید حذف گردیده است. (B) عملکرد RNA راهنما دو در پنج رویان گوسفندی را نشان می‌دهد که در رویان‌های دو و سه در داخل جایگاه هدف یک نوکلئوتید حذف گردیده است.

تجزیه و تحلیل الکتروفروگرام‌های به‌دست‌آمده از توالی‌یابی سانگر و مشاهده تغییرات پیک در هر کلون مثبت، امکان ارزیابی راندمان ویرایش و درصد جهش را فراهم می‌کند که به‌عنوان یک شاخص کلی از کارایی کمپلکس gRNA/Cas9 عمل می‌کند. نتایج توالی با استفاده از نرم‌افزار ICE برای ارزیابی کارایی ویرایش تجزیه و تحلیل شد. این نرم‌افزار با ترازکردن کروماتوگرام‌ها و بررسی پیک‌های هر سلول به‌طور جداگانه درصد سلول‌های ویرایش شده را گزارش می‌دهد. فایل‌های توالی‌یابی از نمونه‌های ویرایش‌نشده، پنج کلون مثبت و توالی‌های RNA راهنما در ابزار تحلیل ICE آپلود شدند. آنالیز سکانس رویان‌های ناک‌اوت شده نشان از این داشت که ۸۳ درصد از سلول‌ها برش خوردند (شکل ۴).



شکل ٤. خروجی نرم‌افزار Synthego

بعد از هم‌ترازکردن توالی ژن MSTN رویان‌های گوسفند ورامینی با رفرنس ژنوم مشاهده شد که توالی گوسفند ورامینی در مقایسه با توالی رفرنس ژنوم که در NCBI ثبت شده است در یک ناحیه ۲۳ نوکلئوتیدی با هم متفاوت هستند (شکل ۵).

بعد از آن‌که دو نوع حذف تک نوکلئوتیدی در دو جایگاه متفاوت رویان‌های گوسفندی ایجاد شد برای تشخیص تأثیرگذاری این ویرایش ژنومی توالی اسیدآمینه‌ای رویان‌ها در گروه کنترل و هم‌چنین در رویان‌های حامل جهش موردبررسی قرار گرفت. در نهایت مشاهده شد که حذف تک‌نوکلئوتیدی که در اثر RNA راهنما یک ایجاد شده است

سبب تغییر در چهارچوب ژنوم و کد خاتمه می‌شود و طول توالی اسیدآمینه‌ای گوسفند ویرایش‌شده کوتاه‌تر از طول توالی اسیدآمینه‌ای گروه کنترل است (شکل ۶).

```
seq.Ncbi   TGCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATCCAAAT
seq.Irani  TGCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATCCAAAT
           ************************************************************

seq.Ncbi   CCTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAACT
seq.Irani  CCTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAACT
           ************************************************************

seq.Ncbi   TTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGGAACTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGA
seq.Irani  TTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGGAACTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGA
           ************************************************************

seq.Ncbi   CAGCAGCGACGGCTCCT-TGGAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAAACGGTCATTA
seq.Irani  CAGCAGCGACGGCTCCTGTGGTAGTCATCGTCTTCCAG-TTACGACGGAAACGGTCATTA
           ***************** ***:**:*.: *:**:***  ********************

seq.Ncbi   CCATGCCCACGGAGTGTGAGTAGTTCTGCTAGGGCAGAGCAACGACTCTGCTGACTGCTG
seq.Irani  CCATGCCCACGGAGTGTGAGTAGTTCTGCTAGGGCAGAGCAACGACTCTGCTGACTGCTG
           ************************************************************
```

شکل ۵. خروجی هم‌تراز کردن توالی اگزون یک MSTN گوسفندی گرفته‌شده از NCBI و گوسفند ورامینی

A

MQKLQIFVYIYLFMLLVAGPVDLNENSEQKENVEKKGLCNACLWRQNNKSSRLEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIR
QLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSCGSHRLPVTTETVITMPTECE–

B

MQKLQIFVYIYLFMLLVAGPVDLNENSEQKENVEKKGLCNACLWRQNNKSSRLEP–

شکل ٦. (A) توالی اسیدآمینه‌ای کنترل اگزون یک MSTN گوسفند. (B) توالی اسیدآمینه اگزون یک MSTN بعد از ناک‌اوت‌شدن.

تکنیک CRISPR/Cas9 از جمله روش‌های سریع، دقیق و کم‌هزینه برای ویرایش ژنتیک است که برای اصلاح حیوانات بسیار امیدوارکننده است. با استفاده از این تکنیک، پژوهش‌گران می‌توانند بهبود نژاد گوسفندان را از طریق تغییر ژنتیک آن‌ها به‌صورت ژنومیک انجام دهند. اصلاح نژاد گوسفند با استفاده از تکنیک CRISPR/Cas9 یک روش جدید در علم ژنتیک است که به پژوهش‌گران امکان می‌دهد تا ژن‌های خاصی را در گوسفندان ویرایش کنند و نژاد موردنظر را بهبود بخشند.

در یک پژوهش، ۱۰ گوسفند ویرایش‌شده ژنی شامل سه گوسفند با حذف قطعات بزرگ به‌دست آمد و هیچ جهش خارج از هدف در حیوانات ویرایش‌شده شناسایی نشد. آن‌ها اذعان کردند که این نتایج، فرضیه گوسفندهایی با حذف قطعات بزرگ می‌توانند به‌طور ایمن و کارآمد با استفاده از CRISPR/Cas9 تولید شوند را ثابت کرده است. علاوه بر این، وزن بدن آن‌ها موردبررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج نشان داد گوسفندهای ویرایش‌شده از لحاظ ژنتیکی سریع‌تر رشد کردند. علاوه بر این، داده‌های فنوتیپی به‌دقت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که حیوانات ویرایش‌شده در مقایسه با حیوانات وحشی افزایش وزن هنگام تولد را نشان دادند (Yi *et al.*, 2020).

مطالعه دیگری نشان داد که ریز تزریق RNA راهنما و CRISPR/Cas9 به زیگوت‌ها یک رویکرد بسیار کارآمد برای به‌دست‌آوردن گوسفند با MSTN ناک‌اوت شده است. بقای رویان و رشد رویان تحت تأثیر ریز تزریق mRNAهای RNA راهنما و Cas9 به سیتوپلاسم قرار نگرفته است. هم‌چنین، هیچ تفاوتی در از بین‌رفتن رویان، میزان تولد و میزان بقای پس از تولد برای هر دو گروه مشاهده نشد، که نشان می‌دهد حیوانات جهش‌یافته به‌اندازه حیوانات وحشی سالم هستند. تعداد ۱۰ رأس بره دارای جهش در ژن MSTN، هشت بره دارای جهش دو آللی و پنج رأس جهش دو آللی خارج از چارچوب بودند. این بره‌ها منجر به ناک‌اوت MSTN و یک فنوتیپ عضلانی مضاعف با افزایش قابل‌توجه وزن بدن در مقایسه با حیوانات نوع وحشی بودند (Crispo *et al.*, 2015).

در مطالعه دیگری که از تکنولوژی CRISPR برای تولید گوسفند حامل MSTN ویرایش‌شده انجام شد، ۷۰ رویان تزریق‌شده با Cas9 mRNA و چهار RNA راهنماکه سه اگزون MSTN گوسفند را هدف قرار می‌دادند به ۱۳ گیرنده منتقل شدند. از ده بره متولدشده از پنج گیرنده پس از حاملگی کامل، نه بره دارای MSTN ناک اوت کامل با جهش‌های مختلف بودند که هیچ ویرایش خارج از هدف یافت نشد. این گوسفندان حامل MSTN ناک اوت‌شده فنوتیپ ماهیچه مضاعف را نشان دادند که با وزن بدن بالاتر در سه و چهار ماهگی، برآمدگی عضلانی برجسته و هیپرتروفی عضلانی مشخص می‌شود (Guo *et al.*, 2023).

پژوهش‌گران دیگری مطابق با گزارش‌های قبلی بیان کردند که اختلال MSTN باعث افزایش وزن بدن در گوسفند می‌شود. این نشان می‌دهد که اختلال ژن از طریق تکنولوژی CRISPR/Cas9 یک روش قابل اعتماد برای بهبود صفات اقتصادی در حیواناتی که در تغذیه انسان تأثیرگذار هستند ارائه می‌دهد. پژوهش ارائه‌شده نشان می‌دهد که فناوری CRISPR/Cas9 توانایی فوق‌العاده‌ای در تغییر مقیاس ویرایش، دقت و امکان‌سنجی اصلاح ژن دارد. این فناوری برای استفاده و توسعه سایر مدل‌های حیوانات بزرگ اهمیت دارد و پشتیبانی فنی و هم‌چنین مواد پرورشی را برای اصلاح پلیمریزاسیون فراهم می‌کند (Chen *et al.*, 2023).

اثرات خارج از هدف با استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas9 می‌تواند در هنگام تلاش برای به‌دست‌آوردن حیوانات ناک‌اوت‌شده برای یک ژن خاص مشکل‌ساز باشد. نرم‌افزار CRISPOR برای RNA راهنما یک، دو ژن MYO18A و ALOX5AP و برای RNA راهنما دو، ژن‌های CEL، OR2G2، CHD4، DDX11، FBF1، C5AR2، ABCA2، SLC4A7، SIDT2و CASP9 را به‌عنوان سایت خارج از هدف[1] در اگزون ۴ شناسایی کرد. گزارش شده استهیچ تفاوتی در توالی خارج از هدف پیش‌بینی‌شده بین گوسفند اصلاح‌شده و وحشی وجود ندارد. در نهایت، در میان هر شش سایت خارج از هدف که برای سه RNA راهنما مختلف برای MSTN بودند طراحی شده، هیچ جهش خارج از هدف در حیوانات اصلاح ژنتیکی‌شده شناسایی نشد که نشان‌دهنده دقت بالای sgRNAهای طراحی‌شده مورد استفاده در مطالعه است. در یک مطالعه دیگر از بین هشت گوسفند ناک‌اوت شده ژن MSTN که متولد شدند برای سایت‌های خارج از هدف پرایمرهایی طراحی شدند و مکان‌های احتمالی خارج از هدف تکثیر و توالی‌یابی شدند تا وجود اثرات احتمالی خارج از هدف ارزیابی شود. یک حذف ۲۷ نوکلئوتیدی در دو نمونه از حیوانات و یک واردشدن نوکلئوتید در یکی دیگر از حیوانات در ناحیه خارج از هدف یافت شد. در هر دو مورد این جهش هتروزیگوت بود. هیچ اثر خارج از هدف دیگری در هفت منطقه ارزیابی شده شناسایی نشد (Crispo *et al.*, 2015).

طی این پژوهش، برای اولین‌بار رویان‌های آزمایشگاهی گوسفند ورامینی را که به‌روش تکنولوژی CRISPR/Cas9 دست‌کاری ژنتیکی شده بود تولید شد. در این مطالعه دو RNA راهنما که اگزون یک ژن میواستاتین را مورد هدف قرار می‌دادند به‌طور هم‌زمان نقش مهمی در حذف یک نوکلئوتید از طریق ریز تزریق به زیگوت ایفا کردند. علاوه بر این،

1. Off-target

حذف نوکلئوتیدی برای RNA راهنما یک اول در بالادست pam بود و برای RNA راهنما دو بین سایت‌های هدف در رویان حذفی MSTN شناسایی شد. ابزارهای مختلف انتخاب RNA راهنما را می‌توان برای جستجوی مکان‌های هدف RNA راهنما بهینه استفاده کرد (Liu *et al.*, 2020). هدف قراردادن اولین اگزون‌های ژن موردنظر برای اطمینان از اختلال کارآمد عملکرد ژن ترجیح داده می‌شود.

نتایج این آزمایش هم حاکی از رویان‌های ناک‌اوت شده ژن MSTN بود که با مطالعات بالا مطابقت داشت و ازآنجایی‌که نتایج حاصل از بررسی توالی اسیدآمینه بین کنترل و رویان‌های ناک‌اوت شده ژن MSTN نشان از استاپ کدون در توالی پروتئینی شدند پس این حذف نوکلئوتیدی می‌تواند در گوسفند ورامینی تأثیرگذار باشد.

باتوجه‌به نتایج تکنولوژی CRISPR/Cas9 با هدایت RNA راهنما دوگانه این سیستم می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای حذف ژن در ژنوم پستانداران پیشنهاد شود (Lv *et al.*, 2020). در نتیجه ویرایش ژنوم در دام نشان‌دهنده یک پیشرفت مهم در بیوتکنولوژی است (Petersonal, 2017) و برای توسعه دامپروری بسیار مهم است. انتظار می‌رود که استفاده از فناوری ویرایش ژن، صفات نامطلوب را هم‌زمان با حفظ صفات اصلی گوسفند بهبود بخشد و مواد اصلاحی تراریخته جدید با ویژگی‌های برجسته را تولید نماید. پژوهش‌های تکنولوژی CRISPR تاکنون بیش‌تر بر روی موش‌ها متمرکز بوده است. با این‌حال، ویژگی‌های ساختار بدن مدل‌های حیوانی بزرگ با موش‌ها متفاوت است. گوسفند به‌عنوان یک دام مهم با ساختار بدنی بسیار نزدیک‌تر به انسان در نظر گرفته می‌شود و کاربرد آن‌ها رویکردهای درمانی بهتری را برای بیماری‌های مزمن انسان ارائه می‌دهد (Yi *et al.*, 2020).

۵. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

ناک‌اوت ژن MSTN در گوسفند ورامینی با تکنیک CRISPR-Cas9 و دو RNA راهنما طراحی شده انجام شد. هر دو RNA راهنما طراحی شده سبب ایجاد جهش در توالی نوکلئوتیدی و ایجاد کد خاتمه در توالی اسیدآمینه شدند. توالی نوکلئوتیدی ژن MSTN در گوسفند ورامینی با توالی ثبت شده در NCBI متفاوت بود. به‌طور خلاصه، تکنیک CRISPR-Cas9می‌تواند در تولید گوشت ایران تأثیرگذار باشد، اما این وابسته به پژوهش‌ها و استفاده از این تکنیک در صنعت دام و کشاورزی در ایران است. هم‌چنین، نگرانی‌های اخلاقی و اجتماعی مرتبط به رویان‌زایی و تغییرات ژنتیکی در حیوانات نیز در استفاده از این تکنیک در صنعت تولید گوشت باید مدنظر قرار گیرد.

۶. تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت از انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۷. تعارض و منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۸. منابع

Ahsani, M., Mohammadabadi, M., & Shamsaddini, M. (2010). Clostridium perfringens isolate typing by multiplex PCR. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *16*, 573-578.

Aiello, D., Patel, K., & Lasagna, E. (2018). The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal genetics*, *49*(6), 505-519.

Chebo, C., Betsha, S., & Melesse, A. (2022). Chicken genetic diversity, improvement strategies and impacts on egg productivity in Ethiopia: a review. *World's Poultry Science Journal*, *78*(3), 803-821.

Chen, M., Zhao, Y., Xu, X., Zhang, X., Zhang, J., Wu, S., Liu, Z., Yuan, Y., Guo, X., & Qi, S. (2023). AMSTN Del273C mutation withFGF5knockout sheep by CRISPR/Cas9 promotes skeletal muscle myofiber hyperplasia via MEK-ERK-FOSL1 axis.

Crispo, M., Mulet, A., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P., Nguyen, T., Crénéguy, A., Brusselle, L., & Anegón, I. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS one*, *10*(8), e0136690.

Dilger, A. C., Gabriel, S., Kutzler, L., McKeith, F., & Killefer, J. (2010). The myostatin null mutation and clenbuterol administration elicit additive effects in mice. *animal*, *4* (3), 466-471.

Guo, R., Wang, H., Meng, C., Gui, H., Li, Y., Chen, F., Zhang, C., Zhang, H., Ding, Q., & Zhang, J. (2023). Efficient and Specific Generation of MSTN-Edited Hu Sheep Using C-CRISPR. *Genes*, *14*(6), 1216.

Kalds, P., Gao, Y., Zhou, S., Cai, B., Huang, X., Wang, X., & Chen, Y. (2020). Redesigning small ruminant genomes with CRISPR toolkit: overview and perspectives. *Theriogenology*, *147*, 25-33.

Kraemer, W. J., & Ratamess, N. A. (2005). Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports medicine*, *35*, 339-361.

Liu, G., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 35-44.

Lv, Q., Yuan, L., Deng, J., Chen, M ,.Wang, Y., Zeng, J., Li, Z., & Lai, L. (2016). Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, *6*(1), 25029.

M Scharenberg, A., Duchateau, P., & Smith, J. (2013). Genome engineering with TAL-effector nucleases and alternative modular nuclease technologies. *Current gene therapy*, *13*(4), 291-303.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *science*, *339* (6), 823-826.

McPherron, A. C., & Lee, S.-J. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, *109*(5), 595-601.

Menchaca, A., dos Santos-Neto, P., Mulet, A., & Crispo, M. (2020). CRISPR in livestock: From editing to printing. *Theriogenology*, *150*, 247-254.

Mohammadabadi, M., Golkar, A., Askari Hesni, M., & Khezri, A. (2023). The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agricultural Biotechnology Journal*, *15*(4), 239-256.

Peterson, A. (2017). CRISPR: express delivery to any DNA address. *Oral Diseases*, *23*(1), 5-11.

Roudbar, M. A., Abdollahi-Arpanahi, R., Mehrgardi, A. A., Mohammadabadi, M., Yeganeh, A. T., & Rosa, G. (2018). Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research*, *160*, 95-102.

Safaei, S. M. H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska ,R., Klopenko, N., & Kalashnyk, O. (2022). An origanum majorana leaf diet influences myogenin gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals*, *13*(1), 14.

Wegner, J., Albrecht, E., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H. J., & Ender, K. (2000). Growth and breed related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of animal science*, *78*(6), 1485-1496.

Yi, D., Zhou, S. W., Qiang, D., Bei, C., Zhao, X. E., Zhong, S., Jin, M. H., Wang, X. L., & Chen, Y. l. (2020). The CRISPR/Cas9 induces large genomic fragment deletions of MSTN and phenotypic changes in sheep. *Journal of Integrative Agriculture*, *19*(4), 1065-1073.

Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Zhang, W., Jin, J., Li, T., & Zhao, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, *120*(2), 1794-1806.

Zhou, S., Kalds, P., Luo, Q., Sun, K., Zhao, X., Gao, Y., Cai, B., Huang, S., Kou, Q., & Petersen, B. (2022). Optimized Cas9: sgRNA delivery efficiently generates biallelic MSTN knockout sheep without affecting meat quality. *BMC genomics*, *23*(1), 348.