Animal Production Research

Vol. 13, No. 2, 2023 (1-14)
doi: 10.22124/ar.2024.26700.1814
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Investigating *DAZL* gene editing in goat embryos using the CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer techniques

A. Pirali[1], S. H. Hosseini Moghaddam[2]*, Sh. Eghbalsaied[3,4], M. Hajian[5], F. Jafarpour[6]**

1. Ph.D. Student in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Professor, Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
4. Professor, Animal Sciences Department, Isfahan branch, Islamic Azad University, Iran
5. Associate Professor, Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
6. Assistant Professor, Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

(Received: 13-02-2024 – Revised: 23-05-2024 – Accepted: 25-05-2024)

Introduction: The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein9) method can create a nucleotide sequence complementary to the target sequence in the desired gene by Guide-RNA (gRNA) together with the Cas9 protein, which is a cutting enzyme for cutting in the both DNA strands of the desired sequence accurately and clearly. The *DAZL* (Deleted in azoospermia-like) gene encodes potential RNA-binding proteins that are expressed in male and female germ cells before and after birth. *DAZL*, which acts by post-transcriptionally binding mRNA in 3' untranslated regions, regulates the germ cell cycle. *DAZL* initiates the sexual differentiation of embryonic germ cells. The transfer and transplantation of gene-edited germ cells into recipient males is an effective method for targeted mutagenesis engineering. In mice knocked out for the Dazl gene, the number of testicular stem cells was reduced and it was found that the *DAZL* gene plays an important role in the differentiation of spermatogonial cells. The purpose of the current research is to edit the *DAZL* gene by knocking it out using the CRISPR/Cas9 technique and transferring the somatic cell nucleus into the genome of the Bakhtiari goat embryo. The inactivation of the gene will be investigated both at the level of the embryonic cell and the resulting embryo. There are no reports on the production of Bakhtiari goat cells and embryos edited for the *DAZL* gene by CRISPR technique and somatic nuclear transfer to improve any traits, including reproductive ones.

Materials and methods: To target the *DAZL* gene and explore (predict) potential off-target genomic sites, guide RNA (20 bp sequences) immediately upstream of each 5′-NGG in the *DAZL* gene was designed using the CHOOPCHOOP tool. Plasmid pX459 (9151 bp) was used to insert the gRNA sequence into the CAS9 vector and determine the characteristics and replication of the vector. This plasmid encodes the Cas9 protein along with the puromycin resistance gene under the promoter/enhancer, CAGGS, as well as the gRNA scaffold under the U6 promoter. Plasmid pX459 was digested by BbsI-HF (NEB #R3539) at 37°C for 10 min, followed by purification by NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Midi kit (#740,986.20, Machery/Nagel). The purified piece was kept at -20°C for later use. Ligation of oligoduplex carrying diluted gRNA sequence (1:20 ratio from 10 µM source) (1

* Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir

** Corresponding author: Shahin080@gmail.com

µL), digested pX459 vector (50 ng), 10x T4DNA ligase buffer (2 µL), and T4DNA ligase (1 µL) in the final concentration of 20 µL of the reaction was carried out. Ligation mixture transformation was performed with NEB 5-alpha Competent *E. coli* (#C2987I) and then placed on agar culture medium with 100 µg/mL ampicillin and incubated at 37$^{\circ C}$ overnight. From the cultured plate, five colonies were selected and each was cultured in LB culture medium, followed by miniprep plasmid extraction (Genejet Plasmid miniPrep kit, #K0502). Plasmids carrying the CRISPR system were transferred into cells through an electroporation system.

Results and discussion: The present results proved the possibility of knocking out the *DZAL* gene using the CRISPR/Cas9 technique in both fibroblast cell lines and Bakhtiari goat embryos. We performed somatic cell nuclear transfer (SCNT) to examine the embryonic developmental capacity to transition to the cleavage and blastocyst stages. The embryos created by knocking out the *DAZL* gene could grow and develop. The sequencing analysis using DECODR (Deconvolution of Complex DNA Repair) software showed the knock-out rate of the *DAZL* gene in fibroblast cells was 83.3% and in cloned blastocysts, it was 55.3%. The rate of blastocyst formation resulting from the cloning process with knockout cells was not significantly different from the control group. Based on these studies, we decided to edit the *DAZL* gene to produce knockout goat embryos by SCNT. The embryos were examined and evaluated with the help of PCR-RFLP test and sequencing. It turned out that in the first iteration, a knockout of 60.66% (the first ten embryos were paid), and in the second iteration, a knockout of 49.99% (the second ten embryos were paid) were achieved. Such mutations have not been described or detected in Iranian Bakhtiari goats, although polymorphisms have been identified. Using genetic sequencing, the mutations were of the INDEL type and were all in the form of frameshift, which resulted in a change in the protein.

Conclusions: The CRISPR/Cas9 system easily influences the desired gene and can be used as a strategy to produce livestock animals that are superior in milk and meat production, reproduction, quality, disease resistance, etc. This research demonstrated the possibility of gene editing using the CRISPR/Cas9 technique in fibroblast cell lines and Bakhtiari goat embryos. The blastocytes produced can be used for transfer to the recipient animal and production of *DAZL* gene knockout goats for further study and optimization of spermatogonial stem cell transplantation.

Keywords: CRISPR/Cas9, *Dazl* gene, Electroporation, Knockout goat, Transfect

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This work was carried out with the support of the Development Headquarters of Biotechnology and Precision Medicine in the form of a grant with unique ID: CT1402091612 in the Biotechnology Research Institute of Royan Research Institute, Iran. In addition, a grant (ref. no. 3.4-IRN-1191261-GF-E) was received from the Alexander von Humboldt Foundation, Germany, for the production of the plasmid.

Acknowledgement: The authors thank Dr. Mohammad Hossein Nasr Esfahani, the Honorable President of Royan Research Institute, Iran. The hard-working researchers and staff of the Royan Research Institute are also thanked and acknowledged. In addition, Prof. Wilfried A. Kues from the Friedrich Loeffler Institute, Germany, is thanked for his assistance in producing the plasmid in this study.

How to cite this article:

Pirali, A., Hosseini Moghaddam, S. H., Eghbalsaied, Sh., Hajian, M., & Jafarpour, F. (2024). Investigating *DAZL* gene editing in goat embryos using the CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer techniques. *Animal Production Research*, *13*(2), 1-14. doi: 10.22124/ar.2024.26700.1814

تحقیقات تولیدات دامی

سال سیزدهم/شماره دوم/تابستان ۱۴۰۳ (۱۴-۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

بررسی ویرایش ژن *DAZL* در ژنوم رویان بز بختیاری با استفاده از CRISPR/Cas9 و تکنیک‌های انتقال هسته سلول سوماتیک

احمد پیرعلی[۱]، سید حسین حسینی مقدم[۲*]، شاهین اقبال سعید[۳و۴‡]، مهدی حاجیان[۵]، فرنوش جعفرپور[۶]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام و طیور، گروه علوم دامی ، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار، گروه علوم دامی ، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان

۵- دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

۶- استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۵)

چکیده

CRISPR/Cas9 در حال ایجاد تغییرات در مهندسی ژنوم و ویژگی‌های مختلف دام به‌ویژه صفات اقتصادی است. *DAZL* یک پروتئین حفاظت شده متصل به RNA است که برای تمایز و توسعه سلول‌های زایا، ضروری است. نرهای ناک اوت شده برای این ژن، قادر به تولید اسپرم نیستند. هدف از این مطالعه، ایجاد رویان بز ناک اوت برای ژن *DAZL* بود. با استفاده از gRNA طراحی شده در وکتور PX459، پلاسمیدها ساخته و کلون شدند. پلاسمید نوترکیب با استفاده از روش الکتروپوریشن به سلول-های فیبروبلاست منتقل شده و سلول‌های ترانسفکت شده با تیمار پورمایسین انتخاب شدند. سلول‌های ویرایش شده از مسیر روند انتقال هسته سلول سوماتیک (شبیه‌سازی)، به تخمک‌های بدون هسته متصل شده و سپس، همجوشی الکتریکی غشای سلولی اعمال شد. رویان‌های حاصل از روند شبیه‌سازی از نظر مراحل رویانی و رسیدن به مراحل تسهیم و بلاستوسیست بررسی شدند. نتایج بررسی بیان ژن، موفقیت تکنیک CRISPR/Cas9 برای سرکوب ژن *DAZL* را نشان داد. نرخ تکوین بلاستوسیت حاصل از روند شبیه‌سازی با سلول‌های ناک اوت شده، تفاوت قابل توجهی با گروه شاهد نداشت. با کمک بررسی توالی‌یابی ژنتیکی، میزان ناک اوت ژن *DAZL* در سلول فیبروبلاست، ۸۳/۳ و در بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه‌سازی، ۵۵/۳ درصد به‌دست آمد. جهش ها از نوع INDEL و همگی به‌شکل تغییر قالب خوانش پروتئین بودند که منجر به تغییر پروتئین می‌شود. بلاستوسیت‌های تولید شده را می‌توان برای انتقال به حیوان گیرنده و تولید بزهای ناک اوت شده برای ژن *DAZL* برای مطالعات بیشتر و بهینه‌سازی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: الکتروپوریشن، بز ناک اوت، تکنیک CRISPR/Cas9، ترانسفکت، ژن *Dazl*

* نویسندهٔ مسئول: hosseini@guilan.ac.ir، ‡ نویسندهٔ مسئول: Shahin080@gmail.com

doi: 10.22124/ar.2024.26700.1814

مقدمه

امروزه بدون وارد کردن ژن خارجی و تنها با ویرایش ژنوم (Genome editing) می‌توانند برخی ویژگی‌های جانوران را تغییر دهند. با استفاده از آخرین روش ویرایش ژنوم یعنی CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein9) که در سال ۲۰۱۳ ابداع شد، امکان تغییر هدفمند ژن و نه تصادفی آن فراهم شده است. در CRISPR/Cas9 (تکرارهای کوتاه پالیندرومیک فاصله‌دار منظم خوشه‌ای)، یک توالی نوکلئوتیدی مکمل توالی هدف در ژن دلخواه (Guide-RNA) همراه با پروتئین Cas9 که یک آنزیم برشی با قابلیت برش در هر دو رشته DNA است، به محل ژن هدف منتقل شده تا در آنجا عمل برش در توالی دلخواه به‌طور دقیق و مشخص انجام شود. بنابراین، می‌توان با حذف و افزودن قطعات DNA خاص در سلول یا ارگانیسم به‌وسیله اندونوکلئازهای طراحی شده، نتیجه دلخواه را به‌دست آورد (Doudna and Charpentier, 2014). در گذشته، ویرایش اولیه ژن مبتنی بر فناوری هدف‌گیری نوترکیبی همولوگ بود که بسیار ناکارآمد و مستعد تأثیرات خارج از هدف بود (Hsu *et al.*, 2014). توسعه بعدی استفاده از اندونوکلئازهای هدفمند برای بخش خاصی از ژنوم است. تاکنون سه نوع اصلی از اندونوکلئازهای هدفمند شامل نوکلئاز انگشت روی (ZNF: Zinc-finger nucleases)، نوکلئازهای فعال‌کننده شبه رونویسی (TALEN: Transcription activator-like effector nucleases) و آخرین مورد آن یعنی CRISPR/Cas برای ویرایش ژنوم استفاده شده است (Ghavi Hossein-Zadeh, 2024).

گزارش شده است که باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس (*Streptococcus thermophilus*) با استفاده از این سیستم، قابلیت از بین بردن ژنوم باکتریوفاژها را دارد (Horvath *et al.*, 2008). این روش به‌عنوان یک ابزار کارآمد در تغییر ژنوم در حیوانات مدل ژنتیکی نظیر موش (Horii *et al.*, 2020 ; Eghbalsaeid *et al.*, 2014)، میمون (Kang *et al.*, 2015)، خوک (Wang *et al.*, 2017) و برخی از دام‌ها نظیر گوسفند (Crispo *et al.*, 2015; Proudfoot *et al.*, 2015) و بز (Wang *et al.*, 2015; Nasr-Esfahani *et al.*, 2011) استفاده شده است.

با توجه به استفاده گسترده از لقاح مصنوعی در تولیدمثل دام، نرها نسبت به ماده‌ها، اهمیت بیشتری پیدا کرده‌اند. استفاده از نرهایی که مایع منی با کیفیت بالا دارند نه تنها منجر به بیشتر شدن تعداد فرزندان می‌شود بلکه به تسریع بهبود ژنتیکی نیز کمک می‌کند (Diskin, 2018). تاکنون ژن‌های متعددی شناسایی شده است که در باروری جنس ماده در دام سبک نقش دارند نظیر *BMP15*، *BMPR-1B*، *GDF9*، *POU1F1*، *FOXL2* و غیره (Badbarin *et al.*, 2014; Abdoli *et al.*, 2016)، لیکن گزارش‌ها برای باروری جنس نر کمتر است.

ژن *DAZL* (Deleted in azoospermia-like) پروتئین‌های بالقوه اتصال RNA را رمزگذاری می‌کند که در سلول‌های زایای (germ cells) جنس نر و ماده قبل و پس از تولد بیان می‌شوند. *DAZL* که با اتصال mRNA پس از رونویسی در مناطق ترجمه نشده ' ۳ عمل می‌کند، چرخه سلولی سلول زاینده را تنظیم می‌کند (Zagore *et al*., 2018). *DAZL* شروعی برای تمایز جنسی سلول‌های زایای رویانی است (KM, 2009; Gill *et al*., 2011) و نقش مهمی در کامل شدن اسپرماتوژنز در پستانداران دارد (Li *et al*., 2020). انتقال و پیوند سلول‌های زایای ویرایش شده ژنی به نرهای دریافت‌کننده، یک روش مؤثر برای جهش‌زایی هدفمند است (González and Dobrinski, 2015; Tang *et al*., 2015; Lara *et al*., 2023). *DAZL* به‌عنوان یک نشانگر سلول زایا در بیضه انسان (Jung *et al.*, 2014) در افراد مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی، بیان کاهشی نشان داد (Hashemi *et al.,* 2018). علاوه بر این، چون بیان این ژن به‌طور چشمگیری در شروع میوز افزایش می‌یابد، می‌تواند به‌عنوان یک محرک ذاتی شروع میوز در سلول‌های زایای پس از مهاجرت عمل کند (Seligman and Page, 1998). در موش‌های دارای کمبود *DAZL*، سلول‌های زایا در نهایت به‌جای شروع گامتوژنز، تحت آپوپتوز قرار گرفتند (Gill *et al.,* 2011). چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) مرتبط با *DAZL* در انسان، تأثیر قابل‌توجهی بر باروری مردان در جمعیت چین داشت. جهش یا حذف ژن *DAZL* منجر به ممانعت از میوز و عقیمی مردان شد (Houston and King, 2000). در تحقیقی گزارش شد که بیان بیش از حد ژن‌های *DAZL*، *DAZ* و *BOULE* در سلول‌های بنیادی رویانی انسان (ESCs) باعث تمایز آن‌ها به PGC شده و PGCهای القا شده حتی میوز را نیز آغاز کردند و

درنهایت سلول‌های زایای هاپلوئید به‌دست آمد (Kee *et al.*, 2009). در موش‌های ناک اوت شده برای ژن *Dazl*، تعداد سلول‌های بنیادی بیضه کاهش یافت و مشخص شد که ژن *DAZL* نقش مهمی در تمایز سلول‌های اسپرماتوگونیال دارد (Schrans-Stassen *et al.*, 2001). در تحقیقی، ژن *DAZ* و *DAZL* انسانی به موشی که ژن *DAZL* آن حذف شده بود منتقل شد (Vogel *et al.*, 2002). موش‌ها وادار به تولید اسپرماتوسیت شدند، لیکن اسپرماتوسیت‌ها به‌طور عمده در مرحله لپتوتن و زیگوتن باقی ماندند و نتوانستند وارد مرحله آنافاز میوز شوند. این شواهد نشان داد که *DAZ* و *DAZL* نقش مهمی در ایجاد سلول‌های زاینده و ورود آنها به میوز دارند. در گوسفند، *DAZL* دارای ۱۱ اگزون با طول ۲۲ کیلوباز است و روی کروموزوم ۱ قرار دارد و یک زنجیره پلی‌پپتیدی متشکل از ۲۵۸ اسیدآمینه را کد می‌کند. بررسی بیان *DAZL* در بیضه گوسفند در چندین مرحله رشد نشان داد که پس از بلوغ جنسی، *DAZL* در بیضه دارای بالاترین سطح بیان است (Li *et al.*, 2020). فیبروبلاست‌های ویرایش شده برای تولید خوک‌هایی با آلل‌های حذفی در ژن‌های *DAZL* و *APC* برای مدل‌سازی ناباروری و سرطان روده بزرگ استفاده شد (Tan *et al.*, 2013).

هدف از پژوهش حاضر، ویرایش ژن *DAZL* با غیرفعال کردن (knockout) آن با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و فناوری انتقال هسته سلول سوماتیک (SCNT) در ژنوم رویان بز بختیاری بود. غیرفعال کردن ژن هم در سطح سلول و هم رویان حاصل از آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

شمای کلی: مراحل مختلف این آزمایش به‌صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است. جزئیات هر بخش در ادامه ارائه شده است.

طراحی guide RNA (gRNA): به این منظور، ابتدا توالی ژن هدف از NCBI انتخاب شده و صحیح بودن ردیف بازها با استفاده از ابزارهای مربوطه بررسی شد. سپس برای اگزون شماره یک ژن *DAZL*، دو gRNA و پرایمر (DAZL188 و DAZL121) طراحی شد (جدول ۱). RNA راهنما (توالی‌های ۲۰ جفت بازی) با استفاده از نرم افزار CHOOPCHOOP طراحی و امتیازدهی شدند (Labun *et al.*, 2019).

برای اتصال gRNA به وکتور حامل CAS9 از پلاسمید pX459 (۹۱۵۱ جفت باز) استفاده شد (شکل ۲). این پلاسمید، ژن Cas9 را به همراه ژن مقاومت به پورمایسین به scaffold gRNA (تحت پروموتر U6) متصل می‌کند.

الحاق (Ligation): اولیگودوپلکس حامل توالی gRNA رقیق‌شده (نسبت ۱:۲۰ از منبع ۱۰ میکرومولار)(۱ µL)، وکتور pX459 هضم شده (۵۰ نانوگرم)، T4DNA×۱۰ لیگاز بافر (۲ µL) و T4DNA لیگاز (۱ µL) در غلظت نهایی ۲۰ µL انجام شد. برای الحاق به‌عنوان مهم‌ترین مرحله همسانه‌سازی، واکنش به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق ادامه یافت. پلاسمید pX459 به‌وسیله BbsI-HF (NEB #R3539) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه هضم شد و به دنبال آن، خالص‌سازی با NucleoSpin Gel و PCR Clean-up Midi kit (#740,986.20, Machery/Nagel) انجام شد. قطعه خالص‌سازی شده برای استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی پلاسمیدها: نتایج نشان داد تمامی gRNAهای ساخته شده در ساختار وکتور همسانه‌سازی شدند. پلاسمیدهای استخراج شده به‌طور همزمان با آنزیم‌های محدود کننده BbsI و EcoRV (Fermentas) هضم شدند. پلاسمیدها با باندهای مورد انتظار برای توالی‌یابی ارسال شدند.

ترانسفرم یا انتقال افقی ژن (transformation): وکتور نوترکیب حاصل از مرحله قبل به باکتری مستعد (NEB 5-alpha Competent *E. coli* (# C2987I) منتقل شد. سپس، محلول باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین قرار داده شد و به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد.

سلول‌های فیبروبلاست: رده سلولی فیبروبلاست بز مورد نیاز از بافت بدن رویان ۴۰ روزه آن ایجاد شد. فیبروبلاست‌ها پنج مرحله در محیط کشت DMEM مکمل شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ تا ۱۵ درصد، گلوتامین (۲ mM)، سدیم پیروات (یک درصد) و پنی‌سیلین استرپتومایسین یک درصد (Pen Strep) تحت گاز CO_2 پنج درصد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت مجدد (پاساژ) داده شدند تا اینکه حدود ۸۰ درصد کف ظرف پر از سلول شد.

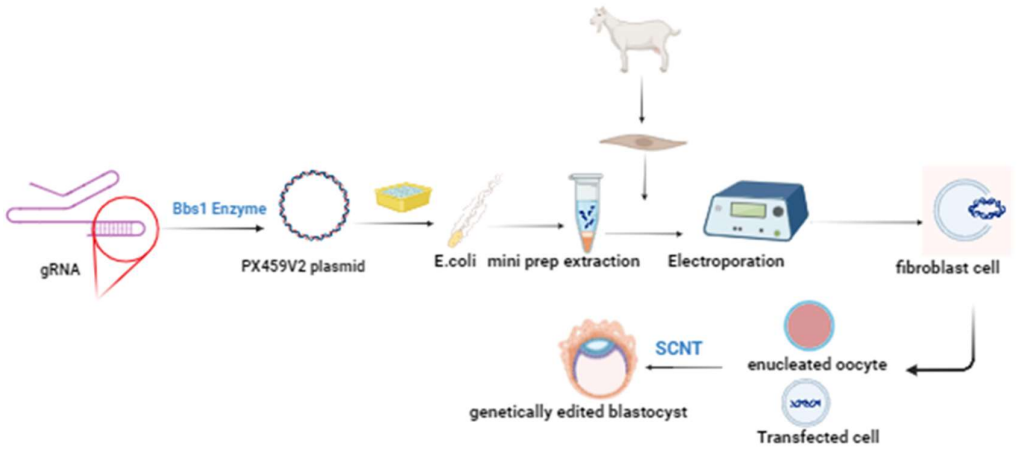

Fig. 1. Schematic diagram of different stages of *DAZL* gene editing in Bakhtiari goat embryo

شکل ۱- شمای کلی از مراحل مختلف ویرایش ژن *DAZL* در رویان بز بختیاری

جدول ۱- توالی دو gRNA (DAZL188 و DAZL121) و پرایمر مربوطه و پرایمر برای تکثیر ژن *DAZL*

Table 1. The sequence of two gRNAs (DAZL188 and DAZL121) and their primers, and primers for *DAZL* gene amplification

	gRNA / Primer	Sequences
1	gRNA/DAZL188	CGACGCCATCTCGCGGAGGC
2	gRNA/DAZL121	CCACCAACGAAAACAGTGTT
3	Primer -Oligo annealing /Dz188_F	CACCGCGACGCCATCTCGCGGAGGC
4	Primer -Oligo annealing/Dz188_R	AAACGCCTCCGCGAGATGGCGTCGC
5	Primer -Oligo annealing/Dz121_F	CACCGCCACCAACGAAAACAGTGTT
6	Primer -Oligo annealing/Dz121_R	AAACAACACTGTTTTCGTTGGTGGC
7	Primer/DAZL F	AGCCTGCAAATCCAGTGATGA
8	Primer/DAZL R	ACAACATTACCCAAATCCCACT

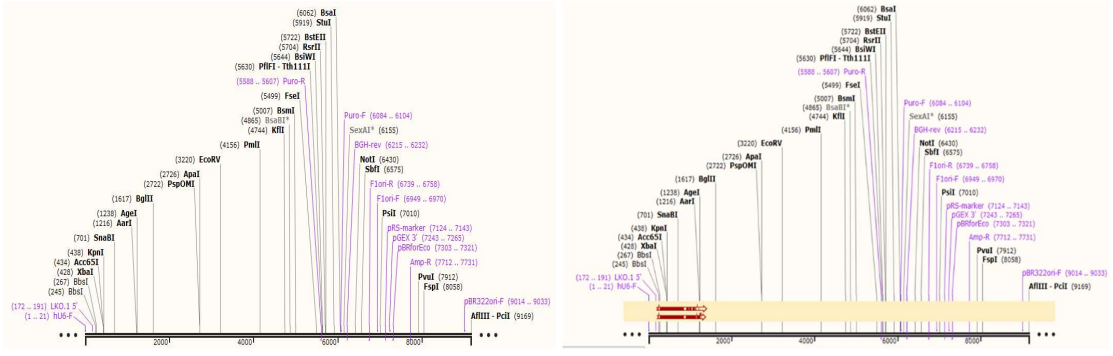

Fig. 2. Genetic map of PX459V2 plasmid. The left side, before the introduction of gRNAs and the right side, after the introduction of gRNAs

شکل ۲- نقشه ژنتیکی پلاسمید PX459V2. سمت چپ، قبل از وارد شدن gRNAها و سمت راست بعد از ورود gRNAها

ترانسفکت سلول‌های فیبروبلاست: انتقال پلاسمیدهای حامل سیستم کریسپر به داخل سلول‌ها از مسیر سیستم الکتروپوریشن انجام شد. بدین منظور، سلول‌های کشت داده شده در یک فلاسک T25 دو مرتبه با محلول PBS شستشو داده شده و سپس جهت جدا کردن سلول‌ها از کف دیش و از همدیگر به مدت سه دقیقه در معرض آنزیم تریپسین قرار گرفتند. غیر فعال کردن آنزیم تریپسین به‌وسیله FBS انجام شد. به‌منظور تهیه پلت سلولی، سوسپانسیون حاصل به‌مدت هفت دقیقه با دور ۱۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس، پلت سلولی حاصل در محیط ترانسفکشن که حاوی ۲۵۰ µL از OptiMEM-GlutamAX است با ۱۰ تا ۲۰ میکروگرم از پلاسمید مخلوط شده و با دستگاه الکتروپوریشن (Bio-Rad) انتقال پلاسمید انجام شد. بدین منظور، دو پالس ۱۰ میلی ثانیه‌ای به فاصله ۱۰ ثانیه با ولتاژ ۲۷۰ ولت در محفظه نگه‌دارنده سلول چهار میلی‌متری اعمال شد. سپس، سلول‌های ترانسفکت شده با آنتی‌بیوتیک پوروومایسین تیمار شدند و در نهایت، آن سلول‌هایی که حامل وکتور بیان شده برای سیستم کریسپر بودند انتخاب شدند.

هم‌ترازی (Alignment) توالی DNA: هم‌ترازی با استفاده از نرم افزار SnapGene بررسی شد تا مشخص شود که کلونینگ gRNA به درستی انجام شده است.

آماده‌سازی اووسیت: به‌منظور تهیه اووسیت، تخمدان‌های بز بلافاصله بعد از کشتار در کشتارگاه‌های صنعتی اصفهان جمع‌آوری شده و در سرم شستشو (نرمال سالین) و دمای ۲۸ تا ۳۲ درجه سلسیوس به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه، کمپلکس اووسیت سلول‌های کومولوس (Cumulus–Oocyte Complexes: COCs) بررسی و فولیکول‌های روشن و فاقد خون با قطر دو تا چهار میلی‌متر با استفاده از سرسوزن گیج ۱۸ متصل به پمپ خلأ، بافت‌برداری و آسپیره شدند و به درون لوله‌های ته مخروطی ۱۰ میلی‌لیتری (conical) تخلیه شدند. لوله‌های مزبور درون بن ماری ۳۸ درجه سلسیوس برای مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار داده شدند تا محتویات سلولی فولیکولی در ته لوله‌ها رسوب نمایند. سپس، رسوب حاصل به‌همراه حجمی از محلول شستشو (TCM Tissue Culture Medium 199) حاوی HEPES و FCS ده درصد در کف پتری دیش‌های نه سانتی‌متری که کف آن‌ها از قبل خط‌کشی‌های موازی (به فاصله ۰/۵ cm سانتی‌متر) شده بود رقیق‌سازی شدند. سپس، محتویات فولیکولی رقیق‌شده در زیر استریو میکروسکوپ از لحاظ وجود COCهای مناسب (سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت به‌همراه حداقل سه لایه فشرده اطرافی سلول‌های کومولوس) بررسی شده و COCهای مذکور با استفاده از پیپت دهانی که به‌اندازه مناسب نازک است (با قطر داخلی برابر با µm ۵۰۰-۴۰۰) به‌همراه کمترین مقدار مایع فولیکولی استحصال شده و به قطره‌های µL ۲۰۰ منتقل شدند. تمامی اووسیت‌های انتخاب شده قبل از انتقال به محیط بلوغ، سه بار در قطره‌های شستشو و نیز دو بار در قطره‌های انتقالی محیط بلوغ شستشو داده شدند. محیط بلوغ TCM199 حاوی سدیم پیروات ۲/۵ mM، گلوتامین ۱ mM، پنی‌سیلین- استرپتومایسین (IU/mL ۱۰۰ پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/mL استرپتومایسین) (v/v) ۱%، 15% FCS (v/v)، 15µg/mL FSH، 15 µg/mL LH، استرادیول ۱۷ بتا (E2) 1 µg/mL و شرایط انکوباسیون بلوغ $38/5^{\circ C}$، Co_2 5%، O_2 5% و بیشینه رطوبت است.

بی هسته‌سازی (Enucleation) اووسیت گیرنده: پس از بلوغ آزمایشگاهی (۲۲-۲۰ ساعت پس از بالغ‌سازی) فقط تخمک‌ها و کومولوس‌های (COC) رشد یافته و بالغ شده که سیتوپلاسم یکنواختی داشتند انتخاب شدند. پس از شستشو در HTCM+10% FCS و به‌منظور حذف سلول‌های کومولوس، COCها به‌مدت ۳۰ ثانیه در قطرات ۲۰۰µL از محیط HTCM+10% FCS حاوی IU/mL ۳۰۰ آنزیم هیالورونیداز قرار داده شدند. پس از جداسازی سلول‌های کومولوس تخمک‌ها (denuding)، تخمک‌های دارای سیتوپلاسم یکنواخت و زوناپلاسیدی مناسب، جهت انجام مراحل انتقال هسته انتخاب شدند. به‌منظور بی‌هسته‌سازی تخمک‌های بالغ شده آزمایشگاهی از دستورالعمل آزمایشگاه پژوهشکده رویان استفاده شد (Nasr-Esfahani *et al.,* 2011). حذف زونا پلاسیدا پس از تیمار تخمک‌ها به‌مدت یک دقیقه در محیط HTCM+0.5% FCS با g/mL ۰/۰۰۲۵ از پروتئاز (Sigma) انجام شد. پس از حذف/برداشت زونا پلاسیدا، تخمک‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند تا تخمک، ساختار طبیعی خود را که در اثر حذف زونا پلاسیدا از دست‌داده بود، مجدداً به‌دست آورد. سپس، این تخمک‌های فاقد زونا پلاسیدا به ظروف حاوی دموکولسین انتقال داده شدند. بی هسته‌سازی با روش دستی انجام شد (شکل ۳) و اووسیت‌هایی که به‌طور

موفقیت‌آمیزی بی‌هسته شدند، مجدداً ۳۰ دقیقه نیز درون محیط بلوغ انکوبه شدند.

انتقال هسته، همجوشی سلولی و فعال‌سازی: جهت انجام انتقال هسته، اووسیت‌هایی که به‌طور موفق فاقد هسته شدند از محیط بلوغ خارج شده و به‌درون ظروف حاوی قطره‌های محیط لکتین منتقل شدند. سپس، یک سلول کاملاً گرد از سلول‌های فیبروبلاستی در تماس نزدیک با غشای سیتوپلاسمی اووسیت فاقد هسته قرار داده شد تا در محیط حاوی لکتین به آن متصل شود.

جهت انجام همجوشی سلولی (Cell Fusion)، اووسیت‌های بازسازی شده (reconstructed) ابتدا در محیط فیوژن (۰/۳ mM Mannitol به‌علاوه ۰/۱ mM $MgS0_4$) شستشو داده شده و سپس بین دو الکترود لام فیوژن (با فاصله mm 5/0) دارای محیط مانیتول انتقال داده شدند. فیوژن سلولی در حدود ۲۷ تا ۲۸ ساعت بعد از بلوغ، با القاء دو پالس الکتریکی مستقیم (DC) با مشخصات kV/cm ۷۵/۱ برای ۸۰ میکرو ثانیه و تأخیر زمانی یک ثانیه در راستای عمود بر سطح تماس دو عضو سلولی (سلول دهنده-گیرنده) انجام پذیرفت. جهت هم‌راستاسازی بهتر سلول گیرنده و دهنده، از یک پالس متناوب (AC) با تواتر KHZ ۸۰۰ قبل و بعد از پالس فیوژن استفاده شد. همجوشی موفق اووسیت‌های بازسازی‌شده یک ساعت بعد از القاء پالس الکتریکی بررسی شد. فعال‌سازی اووسیت‌های مذکور با استفاده از مواجه ابتدایی با Ionomycin (۵μM به مدت یک دقیقه) و سپس فعال‌سازی مجدد در محیط DMAP-۶ به مدت دو ساعت انجام پذیرفت. رویان‌های شبیه‌سازی شده از نظر مراحل تکوین و رسیدن به مراحل تسهیم و بلاستوسیست مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

بررسی صحت کلونینگ gRNA مرتبط با ژن DAZL: با استفاده از نرم افزار SnapGene مشخص شد که ژن *DAZL* تکثیر شده است. به‌عبارت دیگر، هر دو gRNA (CGACGCCATCTCGCGGAGGC / CCACCAACGAAAACAGTGTT) در پلاسمید pX459 در جایگاه مناسب ترانسفکت شد (شکل ۴).

غیرفعال شدگی ژن DAZL: ویرایش ژن *DAZL* پس از القای Cas9 و فعال شدن مسیر اتصال انتهایی غیر همولوگ جهت ترمیم شکستگی‌های دو رشته‌ای در ژن هدف با موفقیت انجام و منجر به ناک اوت ژن *DAZL* شد. مستندات مربوطه به ویرایش ژن *DAZL* در ژنوم بز در دو سطح سلول و رویان بز در ادامه ارائه شده است.

غیرفعال شدگی ژن DAZL در سلول: نتیجه تعیین ژنوتیپ مبتنی بر PCR بعد از غیرفعال شدگی ژن *DAZL* در شکل ۵ قسمت A نشان داده شده است. در این شکل، باند مربوط به شاهد مثبت (wt) که مشاهده آن از قبل انتظار می‌رفت، محصول قطعه bp ۲۵۶ است. باندی برای شاهد منفی (ve) مشاهده نشد و صرفاً عدم آلودگی را اثبات کرد. باند سلول-های ویرایش شده (E) نیز موفقیت آزمایش را نشان داد، ولی برای کسب تأیید و اطمینان از ویرایش، محصولات PCR برای توالی‌یابی ارسال شدند. نتایج توالی‌یابی (سانگر) نشان داد (شکل ۵ قسمت‌های A، B و C) که ویرایش انجام

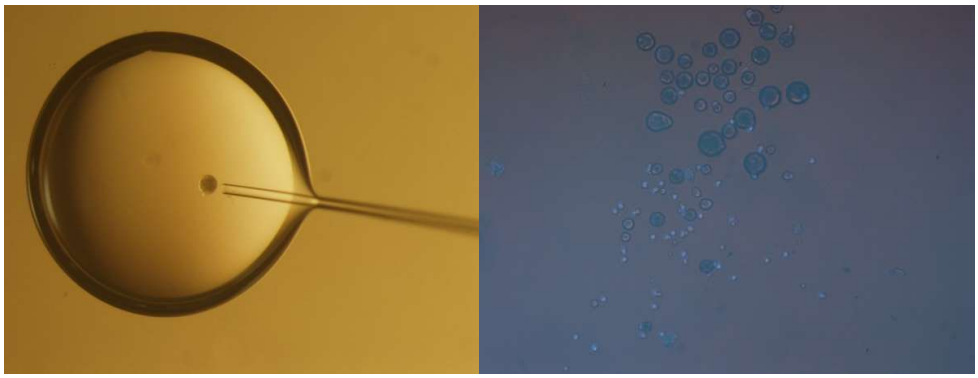

Fig. 3. Left: the oocytes whose nuclei are removed manually with the help of a pipette; Right: the blue dots are the egg nuclei that have been separated from the mature eggs.

شکل ۳- چپ: اووسیت هایی که هسته آن‌ها با روش دستی به کمک پیپت و به آرامی به سمت دیواره خارج می‌شود، راست: نقاط آبی رنگ، هسته تخمک‌ها هستند که از تخمک‌های بالغ جدا شده‌اند.

شده با استفاده از CRISPR/Cas9 سبب ۸۳/۳ درصد سرکوب ژن (ناک اوت) در سلول شده که این نتیجه با استفاده از نرم‌افزار DECODR (Deconvolution of Compelex DNA Repair) مشخص شد.

همجوشی و ادغام سلول: تمام مراحل مربوط به تخمک‌های نابالغ، تخمک‌های بالغ شده، تخمک‌های بالغ برهنه شده، تخمک‌های بدون زونا، مراحل SCNT، همجوشی و ادغام سلول دهنده، تخمک‌برداری و کیفیت مراحل مختلف با توجه به تصاویر معتبر مقایسه شدند (Nasr-Esfahani *et al.*, 2011). ادغام مرحله‌ای سلول دهنده به تخمک در محیط حاوی لکتین در شکل ۶ نشان داده شده است.

Fig. 4. Checking the accuracy of gRNA cloning related to *DAZL* gene
(A: the control plasmid; B: the plasmid with the transferred gRNAs into the vector)

شکل ۴- بررسی صحت کلونینگ gRNA مرتبط با ژن *DAZL*
(A: پلاسمید کنترل، B: پلاسمیدی با gRNAهای منتقل شده به درون وکتور)

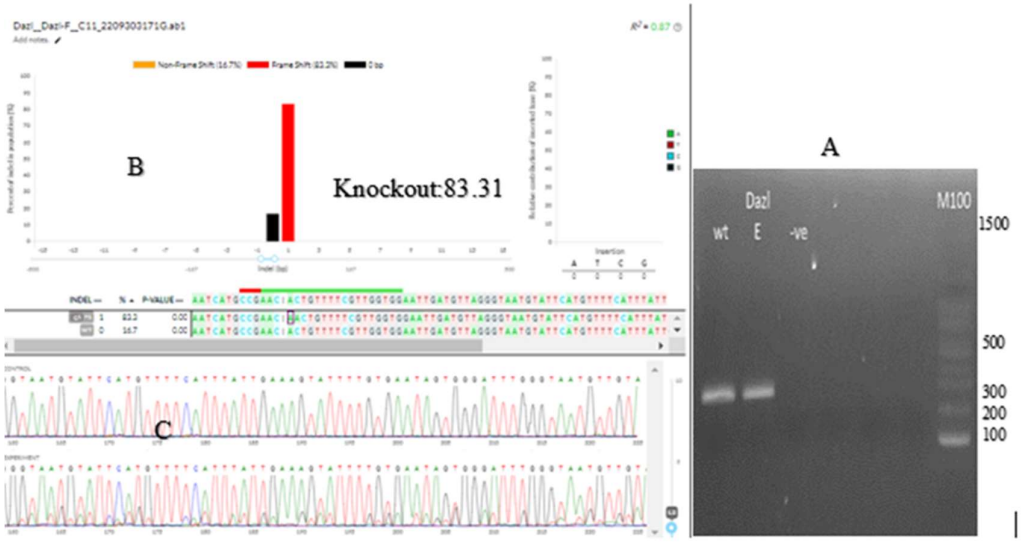

Fig. 5. PCR-based genotyping of positive control cells (wt), negative control cells (ve) edited (E) *DAZEL* gene. The output of the Decoder software, B) 83.3 % knockout in *DAZL* gene of goat embryo, C) the distribution and the percentage of indels in the target region, D) the sequencing trace in the both control and edited groups

شکل ۵- A) تعیین ژنوتیپ مبتنی بر PCR از سلول‌های شاهد مثبت (wt)، شاهد منفی (ve) و ویرایش شده (E)، خروجی نرم‌افزار Decoder، B) ۸۳/۳ درصد ناک اوت در ژن *DAZL* بز، C) توزیع و درصد ایندل‌ها در منطقه هدف، D) ردیابی توالی در دو گروه شاهد و ویرایش شده

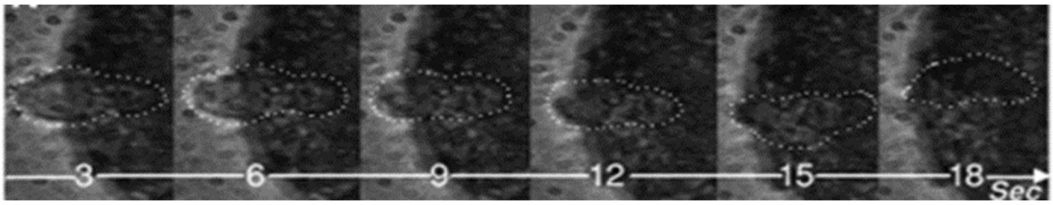

Fig. 6. The stepwise fusion of the donor cell to the oocyte in 18 seconds, which shows the time steps to complete the fusion

شکل ۶- ادغام مرحله‌ای سلول دهنده به تخمک در مدت ۱۸ ثانیه که نشان‌دهنده مراحل زمانی تکمیل همجوشی است

بررسی تکوین رویان‌های شبیه‌سازی شده: رویان‌های شبیه‌سازی شده با سلول‌های فیبروبلاستی از نظر تکوین مراحل رویانی و رسیدن به مراحل تسهیم (cleavage) و بلاستوسیست بررسی شده و با تصاویر موجود در آزمایشگاه مقایسه شدند. تعداد کل تخمک‌ها، تعداد تسهیم رویان و بلاستوسیت‌های گروه شاهد و ویرایش شده ژن مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع، نرخ تکوین رویان خوب بود و از ۴۳۴ تخمک بالغ شده، ۱۵۲ رویان حاصل شد. به‌عبارتی، ۳۵ درصد رویان‌های ایجاد شده با استفاده از سرکوب ژن *DAZL* توانایی رشد و تکوین داشتند. مهم‌تر اینکه تفاوت معنی‌داری (در سطح یک درصد) بین درصد بلاستوسیت این گروه نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۷). در شکل ۷، تعداد تسهیم رویان، نسبت تعداد بلاستوسیست‌ها به تعداد تسهیم و نسبت تعداد بلاستوسیست‌ها به کل تخمک‌های استفاده شده نمایش داده شده است.

غیرفعال شدگی ژن DAZL در رویان: در شکل ۸، ژل آگارز مرتبط با تعیین ژنوتیپ مبتنی بر PCR برای نمونه حاصل از رویان‌ها نشان داده شده است. سلول‌های شاهد مثبت (wt) محصول bp ۲۵۶ را نشان داد که مورد انتظار بود. در شاهد منفی (ve) باندی مشاهده نشد و عدم آلودگی را اثبات کرد و (E1-E2) دو نمونه از بلاستوسیت‌های ویرایش شده ژن *DAZL* بود. دو باندی بودن در E2 نشان‌دهنده وجود large-fragment deletions است و تک باندی بودن نیز نشان‌دهنده احتمال ترمیم DNA در سلول و رویان است که مانع حذف بزرگ شده است.

برای اطمینان از ویرایش ژنوم، نمونه‌های رویان مرتبط با باندهای تکی در آزمایش PCR برای توالی‌یابی نیز ارسال شدند. نتایج توالی‌یابی (سانگر) نمونه‌های ویرایش شده نشان داد (شکل ۹) که جهش از نوع (Insertions and Deletions) Indels است. ویرایش انجام شده سبب ۶۰/۶۶ درصد ناک اوت در تکرار اول و ۴۹/۹۹ درصد در تکرار دوم شد. برای هر تکرار، ۱۰ رویان تلفیق شدند. مقادیر ضریب تعیین (R^2) در این آزمایش نیز نشان داد که تغییرات در ژنوم رویان‌های آزمایشی با دقت بالا بوده است.

میانگین جهش های ایجاد شده در رویان: جدول ۳ نشان می‌دهد که به‌طور میانگین، ۵۵/۳۵ درصد ناک اوت در ژن *DAZL* ایجاد شده است. داده‌های خروجی نرم‌افزار DECODR نشان داد که سرکوب ژن به‌صورت تغییر قالب خوانش پروتئین بود (frameshift) و بدون تغییر قالب خوانش پروتئین (non-frameshift) در هر دو مورد، صفر بود.

جدول ۲- تعداد کل تخمک‌ها، تسهیم رویان و بلاستوسیست‌ها در دو گروه شاهد و ویرایش شده

Table 2. The total number of oocytes, cleavage, and blastocysts in the two control and edited groups

Name	Total	Cleavage	Blastocysts
Control	626	547	208
Edited *DAZL*	434	393	152

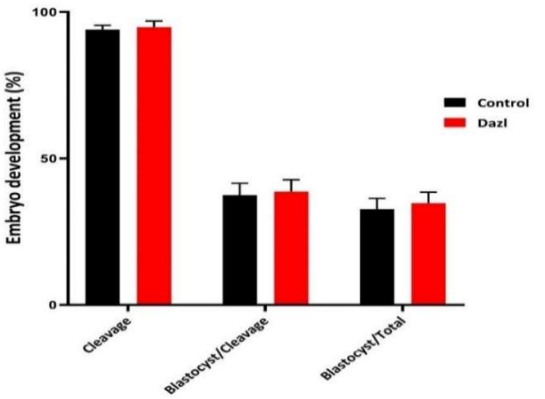

Fig. 7. The produced embryos percentage using cells edited for the *Dazzle* gene

شکل ۷- درصد تکوین رویان‌های تولیدی با استفاده از سلول‌های ویرایش شده برای ژن *DAZL*

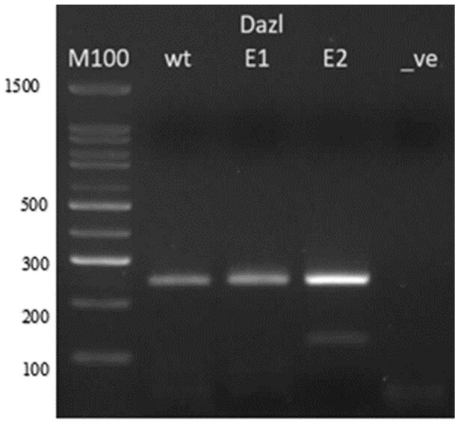

Fig. 8. PCR-based genotyping of positive control blastocyst (wt), negative control blastocyst (ve), and edited (E1-E2) *DAZEL* gene

شکل ۸- تعیین ژنوتیپ مبتنی بر PCR بلاستوسیست شاهد مثبت (wt)، بلاستوسیست شاهد منفی (ve) و ویرایش شده (E1-E2) ژن *DAZEL*

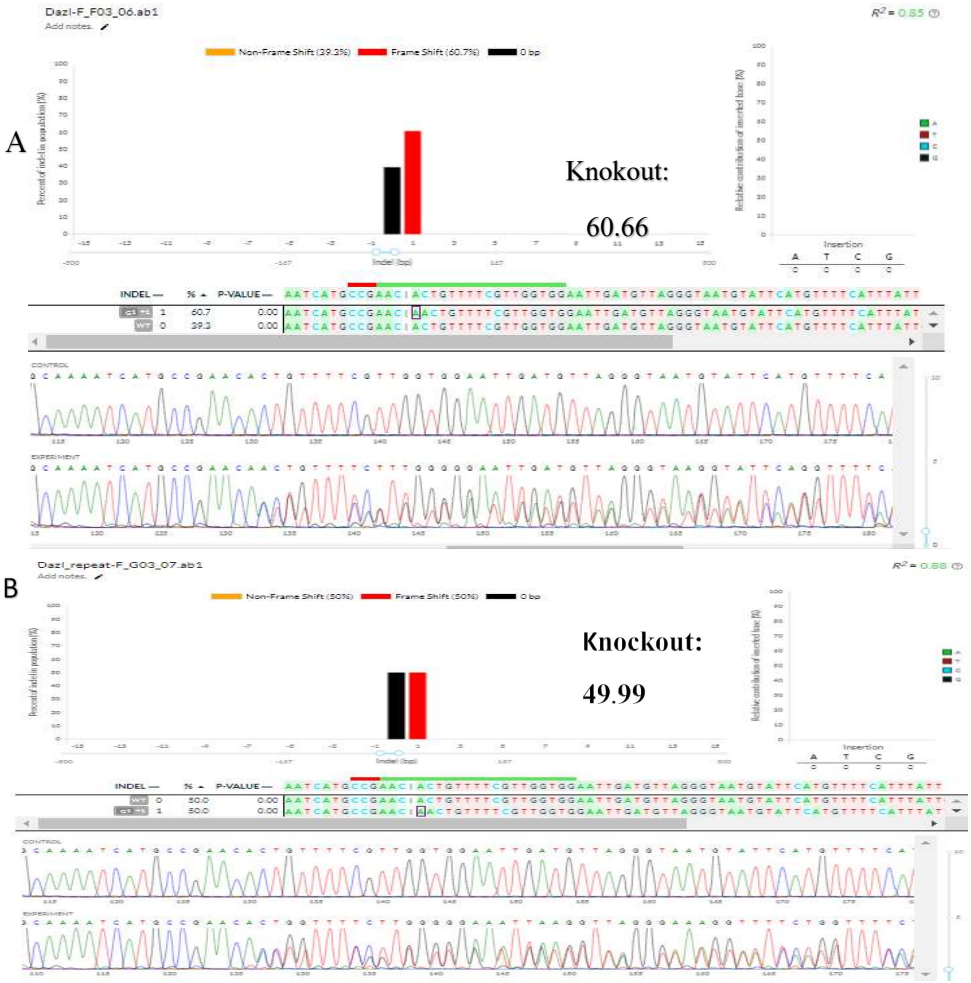

Fig. 9. Output of Decodr software: (A: 66.60% knockout in *DAZL* gene of goat embryo (first repetition), and B: 49.99% knockout in second repetition)

شکل ۹- خروجی نرم افزار Decodr: A) ۶۰/۶۶ درصد ناک اوت در ژن *DAZL* رویان بز (تکرار اول) و B) ۴۹/۹۹ درصد ناک اوت در تکرار دوم

جدول ۳- نرخ جهش‌های ایجاد شده در رویان‌های ویرایش ژنوم شده برای *DAZL*

Table 3. The rate of mutations created in genome editing embryos for DAZL

NAME	WILD	Non-frameshift	Non-frameshift mutations	Frameshift mutations	Total mutations
DAZL128	39.3	39.3	0	60.66	60.66
DAZL121	50	50	0	49.99	49.99
average	44.65	44.65	0	55.35	55.35
SD	5.35	5.35	0	5.35	5.35

بحث

اولین بار، ویرایش مبتنی بر CRISPR در نشخوارکنندگان کوچک برای بررسی عملکردهای زیستی ژن‌هایی با ارزش اقتصادی برای افزایش تولید گوشت مانند ژن *MSTN* (میوستاتین) استفاده شدند (Wang *et al.*, 2015). امروزه سیستم CRISPR/Cas9 به‌راحتی می‌تواند ژن مورد نظر را تحت تأثیر قرار داده و به‌عنوان یک راهبرد برای بهبود عملکرد حیوانات مزرعه که از نظر تولید شیر، تولید گوشت، تولیدمثل، کیفیت محصولات، مقاومت به بیماری و غیره مورد انتخاب ژنتیکی قرار می‌گیرند استفاده شود. نتایج تحقیق حاضر امکان ویرایش ژنوم و سرکوب کردن ژن *DZAL* در رده سلولی فیبروبلاست و رویان‌های بز را اثبات کرد. چون در بزهای نژاد بختیاری ایران چنین جهش‌هایی گزارش نشده بود، لذا سرکوب ژن *DAZL* و تولید رویان با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و SCNT برای نخستین بار در این بز بومی ایران انجام شد.

بیشتر محققان، ژنوم حیوانات را با تزریق هم‌زمان mRNA Cas9 و RNA راهنما (sgRNA) به رویان‌های مرحله تک‌سلولی ویرایش کرده‌اند، ولی سلول‌های سوماتیک آن‌چنان‌که در این تحقیق طی روش انتقال هسته‌ای سلول سوماتیک استفاده شد می‌تواند برای تولید حیوانات با جهش‌های هدف‌دار استفاده شوند. جهش‌های ایجاد شده همگی از نوع تغییر قالب خوانش پروتئین بودند که منجر به تغییر پروتئین می شود. این نوع جهش با SNP متفاوت است. این جهش‌ها، پپتیدهای کوتاه شده، غیرعملکردی و بالقوه سیتوتوکسیک تولید می کنند (Wang *et al.*, 2023). ژن *DAZL* نقش مهمی در رشد سلول‌های زاینده ایفا می‌کند و شروعی برای تمایز جنسی سلول‌های زایای رویانی است (Lara *et al.*, 2023). ویرایش ژنوم گوسفند (CRISPR/dCas9) برای افزایش بیان ژن *DAZL* به‌همراه سه ژن دیگر (*BMP4*، *Nanos3* و *SYCP2*) منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های زایای قوچ شد (Yang *et al.*, 2022). محققان نشان دادند که حذف این ژن در مرحله پس از تولد در سلول‌های زایای موش بر باروری ماده تأثیری نگذاشت، ولی باعث عقیمی کامل جنس نر با از دست دادن تدریجی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، توقف میوز و توقف اسپرماتید شد (Li *et al.*, 2019). در تحقیق حاضر، سرکوب ژن قبل از تولد انجام شد و لذا ادامه این آزمایش با بررسی دستگاه تولیدمثل در رویان‌های تولیدی و بزهای حاصل می‌تواند به درک بهتر نقش ژن *DAZL* در باروری و افزایش عملکرد تولیدمثلی کمک کند. در مطالعه‌ای دیگر بر پایه سیستم CRISPR-Cas9 و فناوری SCNT در خوک، بیش از ۷۰ درصد خوک‌های شبیه‌سازی شده زنده ماندند. در این تحقیق مشخص شد ژن *Nanos3* در تمایز سلول‌های زایای اولیه و حفظ سلول‌های بنیادی نقش حیاتی دارد. سرکوب ژن*Nanos3* در خوک‌ها منجر به نقص کامل در تمایز سلول‌های زایای نر و ماده شد. به‌علاوه در خوک‌های نر، اسپرم در بیضه‌ها قابل مشاهده نبود و در خوک‌های ماده، تخمدان‌ها فاقد فولیکول و تخمک بودند. انتظار می‌رود ناک اوت ژن *DAZL* که در مسیر پایین‌دستی ژن *Nanos3* عمل می‌کند، نتایجی مشابه با ناک اوت Nanos3 داشته باشد (Wang *et al.*, 2023). استفاده از روش TALEN که یک سیستم ویرایش ژن است به‌همراه فناوری SCNT سبب ناک اوت *ژن DAZL* شد (Lara *et al.*, 2023)، که نتایج آن نیز تا مرحله رویانی همسو با نتایج تحقیق حاضر بود.

بررسی خروجی توالی‌یابی ژنوم سلول و رویان نشان داد که ویرایش ژن با موفقیت انجام شده است. ضریب تعیین نیز در آزمایش سلول برابر با ۰/۸۷ و در آزمایش رویان، ۰/۸۵ و ۰/۸۸ بود. بر مبنای مقایسه با گزارش‌های دیگر (Chakrabarti *et al.*, 2019; Bloh *et al.*, 2021)، این مقدار دقت در ویرایش DNA جزء مقادیر با دقت بالا محسوب می‌شود.

Dazl برای تشکیل کیست‌های زایا و تمایز صحیح PGCها (سلول‌های بنیادی زایای اولیه) به GSCها (سلول‌های بنیادی زایا) ضروری است. محققان با استفاده از روش‌های مختلف، از جمله CRISPR/Cas9، بیان *DAZL* را در PGCها دست‌کاری کردند و سپس آثار آن را بر تمایز سلولی و شکل‌شناسی رویان بررسی کردند. محققان دریافتند که *DAZL* برای تشکیل کیست‌های زایا (ساختارهایی کهPGCها را احاطه می‌کنند) و تمایز صحیح PGCها به GSCها ضروری است. در غیاب *DAZL*، PGCها نمی‌توانند کیست‌های زایا را تشکیل دهند و به‌طور صحیح به GSCها تمایز پیدا کنند. این مطالعه نشان داد که *DAZL* نقش مهمی در تمایز PGC به GSC ایفا می‌کند (Bertho *et al.*, 2021). همچنین، تحقیقات نشان داد که CRISPR-Cas9 می‌تواند یک ابزار امیدوارکننده برای درمان گلیوبلاستوما GBM باشد. افزایش بیان *DAZL* با بدخیمی GBM و در نتیجه، کاهش بیان *DAZL* می‌تواند رشد و مهاجرت سلول‌های GBM را مهار کند (Begagic *et al.*, 2024).

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، ۱۵۲ رویان ویرایش شده برای ژن *DAZL* تولید شد که تعداد ۲۰ رویان برای توالی‌یابی استفاده شد و مابقی ذخیره‌سازی شد تا در مرحله بعد به بزهای رضاعی گیرنده انتقال داده شوند. از نرهای متولد شده برای بهینه‌سازی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال و ساخت بزهای ناک اوت شده استفاده خواهد شد که می‌تواند زمینه مطالعات بیشتر جهت درک بهتر تمایز سلول‌های جنسی و توسعه روش‌های جدید برای درمان ناباروری باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله که بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری اصلاح نژاد دام دانشگاه گیلان است با حمایت ستاد توسعه زیست فناورزی و پزشکی دقیق در قالب گرنت با شناسه یکتا CT1402091612 در پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان انجام شد که بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر محمدحسین نصر اصفهانی رئیس محترم پژوهشکده و محققین و کارکنان پرتلاش آن تشکر و قدردانی می‌شود. به‌علاوه، برای تهیه پلاسمید از گرنت با شماره Ref 3.4-IRN-1191261-GF-E مربوط به موسسه آلمانی the Alexander von Humboldt Foundation استفاده شد که بدین‌وسیله از پروفسور Wilfried A. Kues از موسسه Friedrich Loeffler آلمان قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

Abdoli, R., Zamani, P., Mirhosseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, *51*, 631-637. doi: 10.1111/rda.12733

Badbarin, N., Mirhoseini, S. Z., Rabiei, B., & Ghavi Hossein-Zadeh, N. (2014). Identification of QTL for litter size on chromosome 1 in Markhoz goats using SSR markers. *Animal Production Research*, *3*(3), 73-81. [In Persian]

Begagic, E., Beculic, H., Duzic, N., Dzidic-Krivic, A., Pugonja, R., Muharemovic, A., & Pojskic, M. (2024). CRISPR/Cas9-Mediated Gene Therapy for Glioblastoma: A Scoping Review. *Biomedicines, 12*(1), 238. doi: 10.3390/biomedicines12010238

Bertho, S., Clapp, M., Banisch, T. U., Bandemer, J., Raz, E., & Marlow, F. L. (2021). Zebrafish dazl regulates cystogenesis and germline stem cell specification during the primordial germ cell to germline stem cell transition. *Development, 148*(7), dev187773. doi: 10.1242/dev.187773

Diskin, M. G. (2018). Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal, 12*(s1), s75-s84. doi: 10.1017/S1751731118000952

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science, 346*(6213), 1258096. doi: 10.1126/science.1258096

Ghavi Hossein-Zadeh, N. (2024). An overview of recent technological developments in bovine genomics. *Veterinary and Animal Science*, *25*, 100382. doi: 10.1016/j.vas.2024.100382

Gill, M. E., Hu, Y.-C., Lin, Y., & Page, D. C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 108*(18), 7443-7448. doi: 10.1073/pnas.1104501108

González, R., & Dobrinski, I. (2015). Beyond the mouse monopoly: studying the male germ line in domestic animal models. *ILAR journal, 56*(1), 83-98. doi: 10.1093/ilar/ilv004

Hashemi, M. S., Mozdarani, H., Ghaedi, K., & Nasr-Esfahani, M. (2018). Among seven testis-specific molecular markers, SPEM 1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men. *Andrology, 6*(6), 890-895. doi: 10.1111/andr.12528

Horvath, P., Romero, D .A., Coute-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. *Journal of Bacteriology, 190*(4), 1401-1412. doi: 10.1128/JB.01415-07

Houston, D. W., & King, L. (2000). A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in Xenopus. *Development, 127*(3), 447-456. doi: 10.1242/dev.127.3.447.

Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell, 157*(6), 1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010

Jung, H. J., Song, H., & Yoon, M. J. (2014). Stage-dependent DAZL localization in stallion germ cells. *Animal Reproduction Science, 147*(1-2), 32-38. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.03.011

Kee, K., Angeles, V. T., Flores, M., Nguyen, H. N., & Reijo Pera, R. A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature, 462*(7270), 222-225. doi: 10.1038/nature08562

Labun, K ,.Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res, 47*(W1), W171-W174. doi: 10.1093/nar/gkz365

Lara, N. L., Goldsmith, T., Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F., Solin, S., Webster, D., & Bondareva, A. (2023). DAZL knockout pigs as recipients for spermatogonial stem cell transplantation. *Cells, 12*(21), 2582. doi: 10.3390/cells12212582

Li, H., Liang, Z., Yang, J., Wang, D., Wang, H., Zhu, M., & Xu, E. Y. (2019). DAZL is a master translational regulator of murine spermatogenesis. *National Science Review, 6*(3), 455-468.

Li, T., Wang, X., Zhang, H., Chen, H., Liu, N., Xue, R., & Ma, Y. (2020). Gene expression patterns and protein cellular localization suggest a novel role for DAZL in developing Tibetan sheep testes. *Gene, 731*, 144335. doi: 10.1016/j.gene.2020.144335

Nasr-Esfahani, M. H., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Ostadhosseini, S., Abedi, P., & Vojgani, H. (2011). Development of an optimized zona-free method of somatic cell nuclear transfer in the goat. *Cell Reprogram, 13*(2), 157-170. doi: 10.1089/cell.2010.0083

Schrans-Stassen, B. H., Saunders, P. T., Cooke, H. J., & de Rooij, D. G. (2001). Nature of the spermatogenic arrest in Dazl -/- mice. *Biology of Reproduction, 65*(3), 771-776. doi: 10.1095/biolreprod65.3.771

Seligman, J., & Page, D. C. (1998). TheDazhGene Is Expressed in Male and Female Embryonic Gonads before Germ Cell Sex Differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 245*(3), 878-882 . doi: 10.1006/bbrc.1998.8530

Tan, W., Carlson, D. F., Lancto, C. A., Garbe, J. R., Webster, D. A., Hackett, P. B., & Fahrenkrug, S. C. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*(41), 16526-16531. doi: 10.1073/pnas.1310478110

Tang, L., González, R., & Dobrinski, I. (2015). Germline modification of domestic animals. *Animal reproduction/Colegio Brasileiro de Reproducao Animal, 12*(1), 93.

Vogel, T., Speed, R. M., Ross, A., & Cooke, H. J. (2002). Partial rescue of the Dazl knockout mouse by the human DAZL gene. *Molecular Human Reproduction 8*(9), 797-804. doi: 10.1093/molehr/8.9.797

Wang, J., Ren, J., Wang, Q., Li, C., Han, Z., Chen, T., & Hai, T. (2023). Nanos3 knockout pigs to model transplantation and reconstruction of the germline. *Cell Proliferation, 56*(5), e13463. doi: 10.1111/cpr.13463

Wang, X., Yu, H., Lei, A., Zhou, J., Zeng, W., Zhu, H., & Chen, Y. (2015). Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports, 5*(1), 13878. doi: 10.1038/srep13878

Zagore, L. L., Sweet, T. J., Hannigan, M. M., Weyn-Vanhentenryck, S. M., Jobava, R., Hatzoglou, M., Zhang, C., & Licatalosi, D. D. (2018). DAZL regulates germ cell survival through a network of PolyA-proximal mRNA interactions. *Cell Reports, 25*(5), 1225-1240. e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.012