ردیابی و شناسایی سلول‌های بنیادی جنسی در ماهیان خاویاری

شیرین جمشیدی[*1]، ایوب یوسفی جوردهی[1]، طوبی میرزاپور[2] و تورج سهرابی لنگرودی[1]*

۱- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

۲- دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، گروه زیست شناسی تکوینی، رشت، ایران

چکیده

تجدید نسل طولانی ماهیان خاویاری و وضعیت انقراض آنها به جهت شرایط محیطی و تکاملی این گونه‌ها که جزء ماهیان قدیمی می-باشند، و نیز تقاضای بالای محصولات لوکس و گرانقیمت این گونه‌ها از جمله خاویار منجر به کاهش نسل آنها شده است. راهکارهای متفاوتی از قبیل تکثیر در محیط پرورشی و رهاسازی بچه ماهیان در منابع آبی طبیعی برای تجدید نسل این گونه‌ها انجام شده است. با پیشرفت فن‌آوری زیستی و شناسایی سلول‌های بنیادی جنسی، امکان جداسازی این سلول‌ها، ردیابی با نشانگرهای مولکولی مثل بیان ژن-های *nanos1*، *vasa dead end*، و یا غیر مولکولی مثل FITC دکستران، کشت و ذخیره سلول‌های بنیادی زایا در نیتروژن مایع، ذوب سلول‌ها و استفاده به منظور پیوند به تاسماهی دریافت کننده، فراهم شده است. در این میان، استفاده از فن‌آوری زیستی مورفولینو در حذف توالی ژنی، ژن‌های اصلی دخیل در عملکرد سلول‌های بنیادی و نیز استفاده از تکنیک ویرایشی ژنی مثل کریسپرکس می‌تواند راهکار مناسبی را جهت عقیم‌سازی تاسماهی دریافت کننده پیوند ارائه دهد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی جنسی، ژن *nanos1*، *vasa*، *dead end*، مورفولینو و کریسپرکس.

* نویسنده مسئول Jamshidi99@yahoo.com

بیان مسأله

اهمیت ماهیان خاویاری در جهان به دلیل خاویار آنها می-باشد. اما متأسفانه عواملی از قبیل آلودگی آب و دخالت در زیستگاه‌های طبیعی، صید غیرمجاز، ساخت سدهای بزرگ در مسیر رودخانه‌ها و تخریب زیستگاه، این ماهیان را در آستانه خطر انقراض قرار داده است. بطوریکه، ۸۵ درصد گونه‌های ماهیان خاویاری در فهرست IUCN به عنوان گونه‌های در معرض خطر انقراض، فهرست شده-اند. اما عوامل دیگری مانند ماهیگیری تفریحی، واگرایی آب، هیبریداسیون و کاهش عرضه غذا نیز ممکن است بر جمعیت ماهیان خاویاری تأثیرگذار باشد (Ludwig *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011). علاوه بر این، تولیدمثل مصنوعی ماهیان خاویاری نیز به دلیل دیر بالغ شدن و ناتوانی ماده در تکرار هرساله چرخه تولید مثلی، بسیار پیچیده است (Dettlaf *et al.*, 1993). ویژگی‌های تولیدمثلی ماهیان خاویاری شامل تأخیر بلوغ و چرخه‌های تخم ریزی منقطع دوره‌ای این ماهیان امکان بازیابی نسل آنها را دشوارتر می‌کند (Koch and Quist, 2009). بیشتر گونه‌های ماهیان خاویاری، بلوغ جنسی طولانی دارند و دوره‌های رسیدگی جنسی آنها در محیط‌های طبیعی زیست آنها بین ۶ تا ۱۲ سال برای ماهیان نر و ۱۰ تا ۱۸ سال برای ماهیان ماده می‌باشد و این طولانی بودن رسیدگی جنسی و تجدید نسل برای برنامه‌های اصلاح نژاد ماهیان خاویاری یک نقطعه ضعف به حساب می‌آید (Vecsei *et al.*, 2003). فناوری‌های اصلاح مولکولی مثل انتقال ژن[۲] و ویرایش هدفمند ژن[۳] از لحاظ کاهش سن باروری برای سرمایه‌گذاری روی تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری، ایده‌آل می‌باشد. از بین تمامی ماهیان خاویاری، دوره بلوغ جنسی در استرلیاد معمولاً ۳ تا ۷ سال برای نرها و ۵ تا ۷ سال برای ماده‌ها می‌باشد و ژنوم پلی پلوئید آن در مقابل تاسماهیان هگزا پلوئیدی، تتراپلوئید می‌باشد و از این لحاظ به عنوان یک مدل ایده آل چرخه اصلاح ژنتیکی ماهیان خاویاری محسوب شده، و مطالعه آن نسبتاً ساده‌تر است (Chen *et al.*, 2018; Dettlaf *et al.*, 1993). از این لحاظ برای نگهداری سلول‌های جنسی پراهمیت گونه‌های منقرض شده یا در معرض خطر انقراض ماهیان خاویاری، مثل فیل ماهی، تاسماهی استرلیاد میزبان مناسبی برای جایگزینی، دریافت و حفظ سلول‌های بنیادی جنسی می‌باشد.

در مسیر رشد و نمو ماهی از زمان لقاح، منشاء تمامی سلول‌های جنسی (زایا)[۴] چند ده سلول‌های زایای اولیه-ای[۵] می‌باشند که به اختصار به آنها PGCs گفته می‌شود. این سلول‌های زایای اولیه یا سلول‌های بنیادی جنسی از RNA مادری[۶] به نام پلاسم زایا[۷] مشتق شده است که بعداً به محل نمو گنادها حرکت کرده و در آنجا مستقر می‌شوند. PGCs ها عناصر زاینده اساسی گنادها در توسعه گناد هستند و مهاجرت و تکثیر آنها برای ساخت گامت‌ها[۸] و تمایز جنسی ضروری می‌باشد. پدیدار شدن گسترش PGC در ماهی، نگرش‌های اساسی در مورد رشد جنسی، تعیین جنسیت و تمایز جنسی و همچنین یک روش امیدوار کننده برای دستکاری در سیستم تولید مثل ماهی ها را ارائه می‌دهد. امروزه برای تشخیص PGCها در ماهی زنده و تکثیر در محیط کشت حاوی سلول‌های بنیادی زایا از شاخص‌هایی در PGCها که به طور اختصاصی بیان می‌گردند؛ استفاده می‌شود. همچنین PGC ها به عنوان پیش ساز های جنینی گامت-

---

۲ Gene transfer
۳ Gene edition targeted

۴ Germ cell
۵ Primordial germ cells
۶ Maternal RNA
۷ Germplasm
۸ Gametogenesis

ها از اهمیت زیادی در زمینه‌های زیست شناسی و آبزی-پروری برخوردار هستند (Nagano, 2007). به طور کلی، توسعه سلول‌های زایا در لارو و همچنین تولید گامت و تمایز گناد در طول دوران تولید مثلی جانور بالغ به بقاء و تعیین PGC ها وابسته است (Vasconcelos *et al.*, 2019). همانطور که پیش‌تر ذکر شد گونه استرلیاد به جهت رسیدگی سریع‌تر توانسته گونه دریافت کننده سلول های بنیادی زایا برای خیلی از گونه‌های تاسماهیانی باشد که دیرتر به رسیدگی جنسی رسیده و یا در معرض خطر انقراض، می‌باشد. با پیشرفت علم زیست شناسی و ژنتیک و شناسایی سلول‌های بنیادی زایا از راه نشانگرهای پروتئینی و مولکولی اختصاصی آنها در بافت جانور یا محیط کشت سلول‌های بنیادی زایا، امکان جداسازی، کشت در محیط آزمایشگاه و ذخیره سازی آنها به مدت طولانی در نیتروژن مایع برای گونه‌هایی که نسل آنها در معرض خطر انقراض قرار دارد؛ وجود دارد و از این طریق می‌توان سلول‌های بنیادی زایا گونه های منقرض شده یا در معرض خطر انقراض و یا گونه هایی که در سنین بالا و طولانی‌تر به بلوغ جنسی می‌رسند، را به بدن گونه دیگری از ماهیان خاویاری که از نظر ذاتی در سنین پایین تر به بلوغ جنسی می‌رسند؛پیوند[۹]زد و یا در بدن گونه‌های کمتر آسیب پذیر که منقرض نشده و دارای جمعیت‌های زنده و یا جمعیت با تعداد بالاتری می‌باشند؛ نگهداری کرد تا در گونه دریافت کننده تکثیر یافته و سلول‌های جنسی نر یا ماده را تولید کنند که بتوان به راحتی به گامت‌های ماهیان در معرض خطر انقراض دستیابی داشت یا مراحل رسیدگی جنسی در گونه‌هایی که دیرتر رسیدگی جنسی در آنها انجام می شود؛ رسیدگی جنسی سریع‌تر امکان‌پذیر باشد. اما اینجا ممکن است این سئوال پیش آید که سلول‌های بنیادی زایای جانور دریافت کننده چه خواهند شد و آیا تکثیر و رشد گناد ماهی دریافت کننده پیوند[۱۰]ممکن است در کار پیوند ماهی که سلول‌های بنیادی زایای آن پیوند زده شده،[۱۱]خللی ایجاد کند که این مهم در قسمت‌های بعدی توضیح داده خواهد شد. برای کشت سلول‌های بنیادی زایا اول می‌بایست این سلول‌ها با روش‌های مولکولی یا غیر مولکولی تشخیص داده شده و سپس جداسازی شوند؛ این سلول‌ها پس از جداسازی در محیط آزمایشگاه کشت داده شده و برای ذخیره سازی و نگهداری طولانی مدت در ازت مایع و یا انتقال به بدن ماهی دریافت کننده پیوند آماده‌سازی می شوند. در مرحله بعد گونه دریافت کننده سلول‌های جنسی که همان ماهی میزبان می‌باشد؛ نباید حاوی سلول-های جنسی خودی باشد و کار ازبین بردن ذخیره گامتی جانور دریافت کننده تنها از طریق تخریب سلول‌های بنیادی جنسی در مرحله ابتدایی جنینی امکان‌پذیر می‌باشد. کار تخریب این سلول‌ها از طریق روش‌های فیزیکی یا مولکولی که مهمترین آن روش ویرایش ژنوم می‌باشد؛ می‌بایست صورت گیرد.

معرفی دستاورد

ردیابی سلول‌های بنیادی جنسی و نشاندار کردن به روش مولکولی

در سلول‌های زایای جنسی برخی از ژن‌ها به شکل اختصاصی بیان می‌شوند که محل رؤیت آنها فقط این سلول‌ها هستند و معمولاً به شکل اختصاصی از RNA مادری سلول تخمک مشتق می‌شوند. معمولاً برای نشان-دار کردن[۱۲]سلول های زایای جنسی از قسمتی از توالی این ژن‌ها و مناطق تنظیمی 3'UTR آنها به همراه ژن

[۹] Transplant

[۱۰] Recipient or Host

[۱۱] Donor

[۱۲] Labeling

گزارشگر پروتئین سبز فلورسنس[۱۳]استفاده می‌شود که هنگام تشکیل تخم به سلول تخم از طریق روش ریزتزریقی وارد می‌شود. با رشد تخم و تشکیل جنین، مناطقی که به رنگ فلورسنس در می‌آید، نشان‌دهنده سلول‌های زایای جنسی هستند که در ادامه به این نشانگرها پرداخته شده و در مورد آنها توضیح داده می-شود. شایان ذکر است که سازه مولکولی[۱۴]که برای نشان دار کردن سلول‌های بنیادی جنسی استفاده می‌شود، حاوی منطقه تنظیمی 3'UTR می‌باشد که این مناطق در بسیاری از جانوران حفاظت شده است و نتایج نشان داده که به کارگیری منطقه تنظیمی 3'UTR گورخرماهی[۱۵]برای ماهیان خاویاری هم قابل استفاده بوده است (Kedde *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017).

ژن‌های اختصاصی قابل بیان در سلول‌های بنیادی جنسی

خانواده ژن nanos: خانواده ژن *nanos* برای توسعه مسیر تشکیل سلول‌های مولد یا تولید کننده گامت در موجودات مختلف ضروری است. بر طبق مطالعات Ye و همکاران (۲۰۱۲)، با روش ایمونوفلوروسنس مشخص شد که *nanos1* در سیتوپلاسم اووسیت‌های اولیه ماهی خاویاری چینی ۲/۵ ساله وجود دارد. همچنین *nanos1* در سیتوپلاسم اسپرماتوسیت‌های اولیه و اووسیت‌های اولیه ماهی خاویاری چینی ۴/۵ ساله نیز تشخیص داده شد. بنابراین، *nanos1* می‌تواند نشانگر مناسبی جهت شناسایی اووسیت اولیه و اسپرماتوسیت‌ها باشد (Ye *et al.*, 2012). تاکنون روش‌های زیادی برای جداسازی و شناسایی PGC ها مطرح شده است. به عنوان مثال تفکیک سلول‌های زایای جنسی از سلول‌های سوماتیک در ماهی استخوانی گورخرماهی با استفاده از روش ریزتزریقی[۱۶]انجام شده است. این فرایند با استفاده از یک mRNA مصنوعی صورت گرفت که این mRNA از اتصال پروتئین سبز فلوئورسنس به بخش 3'UTR ژن *nanos3* ساخته شده بود (Koprunner et al., 2001).

خانواده ژن vasa: این خانواده ژنی هم درست به مانند ژن*nanos1*، تنها در سلول‌های بنیادی جنسی بیان می شود. به طور کلی، mRNA و پروتئین vasa در تخمدان، بیان میوزی و میتوزی داشته، ولی در بیضه به طور عمده بیان میتوزی نشان می‌دهند. علاوه بر این، در سیتوپلاسم و در هسته‌ی سلول‌های زایای تخمدان حضور داشتند، اما در مورد بیضه تنها در سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده شدند (Rzepkowska *et al.*, 2014).

ژن dead end: علاوه بر ژن‌های *nanos* و *vasa* نشانگر دیگری که برای ردیابی و شناسایی PGC ها استفاده می‌شوند، ژن *dead end* (*dnd*) می‌باشد. این ژن یک نوع پروتئین متصل شونده به RNA را رمزگذاری می‌کند و برای مهاجرت PGC و گامتوژنز در مهره داران ضروری است. Yang و همکاران (۲۰۱۵)، با استخراج این ژن و انجام فن‌آوری *Real time PCR* مشخص کردند که رونوشت های این ژن مختص غدد جنسی بوده و از والد مادر منشاء می‌گیرد. بنابراین، *dnd* می‌تواند به عنوان نشانگر سلول‌های بنیادی در ماهیان خاویاری مورد استفاده قرار گیرد (Yang *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای دیگر، Jin و همکاران (۲۰۱۹)، نشان دادند ژن‌های *nanos3*، *piwil1*، *piwil2*، *dnd* و *vasa* به عنوان ژن‌های هدف بالقوه برای عقیم سازی در ماهی تیلاپیای نیل[۱۷]مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ژن‌ها

[۱۳] Fluorescence
[۱۴] Construct
[۱۵] *Danio rerio*
[۱۶] Microinjection
[۱۷] *Oreochromis niloticus*

منحصراً در غدد جنسی بیان شده و از ژنوم مادری به ارث می‌رسند (Jin *et al.*, 2019).

ردیابی سلول‌های بنیادی جنسی و نشاندار کردن به روش‌های غیر مولکولی

برای نخستین بار Saito و همکاران (۲۰۱۴)، نشانگر جدیدی به نام FITC-dextran را برای نشان دار کردن PGCمعرفی کردند. این اولین روش زیست شناسی غیر مولکولی در شناسایی PGC ها در شرایط *In vivo* می‌باشد. در این روش از تزریق فلوئورسین تیوسیانات (FITC)- دکستران با وزن مولکولی ۵۰۰ کیلو دالتون به قطب گیاهی جنین‌های مرحله ی ۴-۱ سلولی برای ردیابی PGC ها تا زمان تشکیل لارو و رسیدن سلول‌ها به ستیغ تناسلی استفاده شد (Saito *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای دیگر (۲۰۱۷)، برای برچسب گذاری سلول‌های بیضه‌ای جدا شده از گونه‌ی تاسماهی رودخانه یانگ تسه[۱۸]و سلول‌های تخمدان جدا شده از گونه‌ی ماهی خاویاری چینی[۱۹]از رنگ فلوئورسنت PKH26 استفاده شد (Ye *et al.*, 2017).

جداسازی سلول‌های PGC

استخراج سلول‌های بنیادی از طریق روش هضم آنزیمی

برای استخراج سلول‌های بنیادی جنسی در جانوران مختلف شیوه‌های متفاوتی استفاده شده است. در تحقیقی برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از آنزیم-های کلاژناز ۰/۱ درصد و تریپسین ۰/۲۵ درصد استفاده شده است. همچنین برای جداسازی سلول‌های بنیادی زایا که در مراحل مختلف تکوین قرار داشتند، از سرعت رسوب‌گذاری در یک گرادیان غلظت از درصد ۲٪ تا ۴٪ BSA که استفاده شده بود، بهره بردند (Brinster and Zimmermann, 1994). بدین منظور، پس از جدا سازی گناد اولیه از ماهی جوان یا خردکردن مکانیکی جنین و لارو، از آنزیم‌های تریپسین و کلاژناز برای استخراج سلول‌های بنیادی جنسی استفاده می‌شود؛ همچنین می-بایست توجه شود چون تعداد سلول‌های بنیادی جنسی چند ده سلول است؛ بنابراین، پیدا کردن آنها در گناد توسعه یافته سخت‌تر است و معمولاً در ماهیان جوان و لارو کار هضم فیزیکی و آنزیمی راحت‌تر خواهد بود.

حذف سلول‌های بنیادی زایا با استفاده از دست‌کاری ژنتیکی و فیزیکی

در تاسماهیانی که می‌بایست PGC گونه دیگری را دریافت کنند، سلول‌های PGC خودشان می‌بایست قابلیت تولید سلول‌های جنسی را نداشته باشد. بدین منظور، تا به حال از روش‌های فیزیکی و مولکولی برای حذف PGC از جنین میزبان استفاده شده است. روش فیزیکی که تا به حال برای ماهیان خاویاری مورد استفاده بوده است، شامل استفاده از UV می‌باشد. Saito و همکاران (۲۰۱۸)، از روش حذف فیزیکی با اشعه UV برای حذف PGCها در ماهی استرلیاد استفاده کردند. اما نتایج آنها نشان داد این روش تنها باعث کاهش تعداد سلول‌هایPGC در میزبان می‌شود و باعث حذف کامل این سلول‌ها نخواهد شد. بنابراین، برای حصول نتیجه صد درصد حذف PGC کنار گذاشته شد. دو روش حذف ژنتیکی (مولکولی) که بر اساس حذف کامل mRNA ژن نشانگر سلول‌های PCG بنا گذاری شده است (ژن *dead end*). همچنین باید متذکر شد که در روش‌های مولکولی عقیم سازی غدد جنسی دریافت کننده پیوند نیز باید از نظر ژنتیکی با غدد جنسی اهداکنندگان سازگار باشند (Saito *et al.*, 2011; Ogawa *et al.*, 1999;).

[۱۸] *Acipenser dabryanus*
[۱۹] *Acipenser sinensis*

حذف ژنوم سلول‌های بنیادی جنسی در تاسماهی دریافت کننده سلول‌های بنیادی جنسی به روش مورفولینو[۲۰]

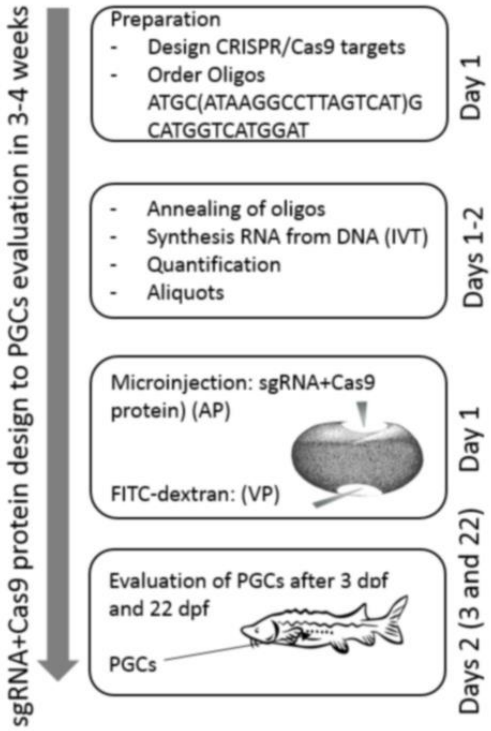
روش‌های عقیم‌سازی رایج در ماهی‌ها مانند تریپلوئید کردن یا هیبریداسیون، عقیمی قطعی در ماهیان خاویاری را تضمین نمی‌کنند. در روش دیگر کارآمد، عقیم‌سازی را می‌توان با استفاده از یک ژن موقتی در سلول‌های PGC توسط یک عامل از بین برنده، مثل الیگونوکلئوتید مورفولینو آنتی‌سنس[۲۱]به دست آورد. ژن مورد نظر برای مورفولینو، ژن ***dead end*** است که یک ژن اختصاصی مهره داران است که پروتئین اتصال دهنده RNA را کد می‌کند که برای مهاجرت و بقای سلول‌های زایای اولیه PGCs ضروری می‌باشد. برای این منظور در تاسماهی استرلیاد از همولوگ ژن ***dead end*** ماهیان خاویاری روسی[۲۲]که منجر به همان توالی در ناحیه کدون شروع در تاسماهی استرلیاد می باشد؛ استفاده شده است (Linhartova *et al.*, 2015). واکنش زنجیره ای پلیمراز رونویسی معکوس، بیان خاص بافتی ژن ***dead end*** را در غدد جنسی هر دو جنس تأیید کرد. Dnd-MO برای ردیابی PGCs همراه با FITC-dextran برای برچسب زدن PGCs به ناحیه گیاهی جنین تاسماهی استرلیاد یک تا چهار سلولی تزریق شد. در گروه‌های شاهد، فقط FITC برای تأیید روش تزریق و برچسب‌گذاری PGCها تزریق شد. پس از بهینه‌سازی غلظت مورفولینو همراه با تزریق حجمی مناسب، غلظت ۲۵۰ میکرومولار برای عقیم‌سازی جنین‌های ماهیان خاویاری استفاده شد. سلول‌های زایای اولیه با استفاده از یک استریومیکروسکوپ فلورسنت تنها در برجستگی تناسلی گروه شاهد نشاندار شده با FITC شناسایی شدند. در حالی که، هیچ PGC در حفره‌های بدن تاسماهیان مورفانت[۲۳](ماهیان دریافت کننده مورفولینو) در ۲۱ روز پس از لقاح وجود نداشت. علاوه بر این، حفره‌های بدن ماهی‌های تیمار شده با مورفولینو و ماهی‌های تیمار نشده توسط بافت‌شناسی و هیبریداسیون درجا[۲۴]مورد بررسی قرار گرفت و غدد جنسی را نشان داد که در مراحل مختلف (۶۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ روز پس از لقاح)، سلول‌های زاینده در مورفانت‌ها نداشتند. در مجموع، این نتایج اولین روش شناخته شده مولکولی و کاربردی عقیم‌سازی ماهیان خاویاری را گزارش کرد.

از بین بردن ژنوم سلول‌های بنیادی جنسی در تاسماهی دریافت کننده سلول‌های بنیادی جنسی به روش کریسپر کس[۲۵]

ویرایش هدفمند ژنوم یکی از ابزارهای تغییر ژنوم می‌باشد که بر پایه ویرایش ژن سیستم ایمنی باکتری و آرکی[۲۶]ها پایه‌ریزی شده است. این سیستم توانایی برش ژنوم از منطقه مورد هدف و داخل کردن توالی جدید مورد نظر و حذف توالی قبلی را دارد که اصطلاحاً به آن کپی[۲۷]برش و چسباندن گفته می‌شود. سیستم کریسپر کس سیستمی متشکل از یک پروتئین نوکلئاز (CAS9) متصل به (CRISPR)RNA می‌باشد که توسط باکتریها و آرکی‌ها برای جلوگیری از تهاجم عوامل ژنتیکی بیگانه مانند ویروس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. مولکول RNA توالی چند نوکلئوتیدی کوتاهی است که با اتصال به DNAخارجی، امکان تجزیه آن را توسط آنزیم CAS9 فراهم می‌کند. این RNA به نام RNA فعال سازی

[۲۰] Morpholino
[۲۱] Morpholino oligonucleotide antisense
[۲۲] *Acipenser gueldenstaedtii*
[۲۳] Morphants
[۲۴] *In situ hybridization*
[۲۵] CRISPR/CAS9
[۲۶] Archaean
[۲۷] Copy, cut and paste

کریسپر[۲۸]به همراه آنزیم CAS9 زمانی می‌توانند قطعه دو رشته‌ای DNA را هدف قرار دهند که متصل به توالی مجاور PAM در دو رشته ای DNA شود. دو عضو مهم در این فرآیند آنزیم CAS9 و RNA کریسپر که همان RNA راهنما[۲۹]می‌باشند؛ وجود دارد. ویرایش ژنوم در موجودات مختلف فقط با تغییر ۲۰ نوکلئوتید از RNA راهنما انجام می‌شود. توالی که می‌بایست در آن تغییر ایجاد شود، به شکل الیگو نوکلئوتید سفارش داده شده و در سازه‌های ژنی[۳۰]کلون شده و سپس RNA راهنما از روی سازه ژنی طراحی شده، در محیط آزمایشگاه توسط RNA پلی مراز که یک آنزیم است؛ ساخته شده و DNA باقی مانده با آنزیم *DNase* حذف شده و پس از مناسب سازی غلظت RNA راهنما با آنزیم CAS9 مخلوط شده و به جنین یک سلولی تزریق می شود. در تاسماهی استرلیاد به منظور حذف ژن ***dead end*** که ژن اصلی در سلول‌های PGC است و در مهاجرت و زنده مانی این سلول ها نقش دارد؛ از روش کریسپر کس استفاده شده است (Baloch و همکاران؛ ۲۰۱۹). این RNA راهنما و آنزیم CAS9 همراه با یک نشانگر غیرمولکولی مثل FITC دکستران همراه‌سازی می‌شوند تا بتوان درصد موفقیت در حذف سلول‌های PGC در سلول‌های میزبان و همینطور ردیابی PGCها در نمونه شاهد را به نحو مطلوبی انجام داد. جنین‌هایی که از این طریق انتقال ژن در آنها به شکل موفقیت‌آمیزی انجام شده است؛ دارای ژنوم تغییر یافته ای متفاوت با ژن ***dead end*** خواهند بود که قابلیت سلول‌های PGC برای مهاجرت در محل تشکیل گنادها و تکثیر سلول‌های جنسی در آنها مختل خواهد شد.



شکل ۱- طراحی RNA راهنما و ترکیب با آنزیم CAS9 و ارزیابی سلول‌های PGC در پاسخ به سرکوب ژن *dead end* در تاسماهی استرلیاد در مدت ۳تا ۴ هفته

توصیه ترویجی

با توجه به اینکه ماهیان خاویاری دریای خزر به ویژه فیل‌ماهی جزء گونه‌های در معرض خطر انقراض می‌باشند و دوره تجدید نسل آنها طولانی می‌باشد؛ می‌بایست راهکارهای زیستی و ژنتیکی جدید برای حفظ نسل این گونه‌ها به شرح ذیل در نظر گرفته شود :

–جداسازی، شناسایی و کشت سلول‌های بنیادی زایا (جنسی)

– ذخیره سلول‌ها در نیتروژن مایع

– کشت و ازدیاد دوباره آنها در محیط آزمایشگاه

[۲۸] RNA trans activating CRISPR
[۲۹] SgRNA (guide RNA)
[۳۰] Gene construct

– پیوند زدن به ماهی میزبان

با توجه به اینکه عقیم‌سازی ماهی میزبان و دریافت کننده سلول‌های بنیادی زایای ماهی اهداکننده خود نیازمند راهکار زیستی و مولکولی برای از بین بردن ژن‌های دخیل در مهاجرت سلول‌های بنیادی زایا می‌باشد؛ می‌بایست تمهیدات لازم برای داشتن ماهی عقیم نیز به موازات ردیابی، شناسایی و کشت سلول‌های اهدا کننده پیوند، فراهم شود.

منابع

Baloch, A.R., Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Rodina, M. and Pšenička. M. 2019. Dnd1

knockout in sturgeons by CRISPR/Cas9 generates germ cell free host for surrogate production.

Animals 9, 174.

Brinster, R.L. and Zimmermann, J.W. 1994. "Spermatogenesis following male germ-cell transplantation", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 91 No. 24, pp. 11298–11302.

Chen, S., Zeng, M., Sun, H., Deng, W., Lu, Y., Tao, D., Liu, Y., Zhang, S. and Ma, Y. 2010. Zebrafish

Dnd protein binds to 3'UTR of geminin mRNA and regulates its expression. BMB. Rep. 43,

438-444.

Chen, J., Wang, W., Tian, Z., Dong, Y., Dong, T., Zhu, H., Zhu, Z., Hu, H., and Hu, W. 2018. Efficient Gene Transfer and Gene Editing in Sterlet (*Acipenser ruthenus*). Front. Genet. 2018, 9, 117. [CrossRef][PubMed]

Cheng F, Pan Y, Lu Y-M, Zhu L, Chen S .2017 RNA-binding protein Dnd1 promotes breast cancer apoptosis by stabilizing the Bim mRNA in a miR-221 binding site. BioMed Res Int. https://doi.org/10.1155/2017/9596152

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I. 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture; Springer-Verlag: New York, NY, USA.

Jin, Y.H., Davie, A. and Migaud, H. 2019. Temperature-induced testicular germ cell loss and recovery in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Gen Comp Endocrinol. 2019 Nov 1; 283:113227. doi: 10.1016/j.ygcen. 2019.113227. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31348956.

Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., Lund, A.H., Perrakis, A., Raz, E. and Agami, R.

DA, Yoshizaki G. Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish Colossoma macropomum. Gene. 2019 Jan 30; 683:54-60. doi: 10.1016/j.gene.2018.10.027. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30316926.

Vecsei, P., Litvak, M.K., Noakes, D.L , Rien, T and Hochleithner, M. 2003. A Noninvasive Technique for Determining Sex of Live Adult North American Sturgeons. *Environmental Biology of Fishes* **68**, 333–338. https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000005732.98047.f3

Yang, X., Yue, H., Ye, H., Li, C. and Wei, Q. 2015."Identification of a germ cell marker gene, the dead end homologue, in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*", Gene, Elsevier B.V., Vol. 558 No. 1, pp. 118–125.

Ye, H., Chen, X., Wei, Q., Zhou, L., Liu, T., Gui, J., Li, C., *et al.* 2012, "Molecular and expression characterization of a nanos1 homologue in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*", Gene, Elsevier B.V., Vol. 511 No. 2, pp. 285–292.

Zhang, H., Wei, Q.W., Kyanrd, B.E., Du, H., Yang, D.G. and Chen, X.H. 2011. Spatial structure and bottom characteristics of the only remaining spawning area of Chinese sturgeon in the Yangtze River. J. Appl. Ichthyol. 27, 251–6.

2007. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. Cell 131,

1273–1286.

Koch, J.D. and Quist, M.C. 2009. Effects of commercial harvest on shovelnose sturgeon populations in the Upper Mississippi River. N. Am. J. Fish. Manage. 29, 84–100.

Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. 2001. "A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells", Genes and Development, Vol. 15 No. 21, pp. 2877–2885.

Linhartová, Z., Saito, T., Kašpar, V., Rodina, M., Prášková, E., Hagihara, S. and Pšenička, M. 2015. Sterilization of sterlet *Acipenser ruthenus* by using knockdown agent, antisense morpholino oligonucleotide, against dead end gene. Theriogenology. 2015 Oct 15;84(7):1246-1255.e1. doi: 10.1016/j. theriogenology. 07.003. Epub 2015 Jul 11. PMID: 26248520.

Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky, V., Jenneckens. I., 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). Genetics 158, 1

Nagano, Makoto C, and Jonathan, R Yeh. 2013. "The Identity and Fate Decision Control of Spermatogonial Stem Cells: Where Is the Point of No Return?" *Current Topics in Developmental Biology* 102: 61–95.

Rzepkowska. M., Ostaszewska, T., Gibala, M., Roszko, M.L. 2014. Intersex gonad differentiation in cultured Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon. Biol Reprod. 2014 Feb 13;90(2):31. doi: 10.1095/biolreprod.113.112813. PMID: 24403549.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E. 2011. The mechanism for primordial germ cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. PLoS ONE 6(9): e24460.

Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K. and Yamaha, E. 2014. "The Origin And Migration Of Primordial Germ Cells In Sturgeons", edited by Klymkowsky, M.PLoS ONE, Vol. 9 No. 2, p. e86861.

Vasconcelos ACN, Streit DP Jr, Octavera A, Miwa M, Kabeya N, Freitas Garcia RR, Rotili

Tracing and identifying Primordial germ cells in wild sturgeon stocks

Shirin Jamshidi[1], Ayoub Yousefi Jourdehi[1], Tooba Mirzapour[2] and Tooraj Sohrabi[1]*

1-International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

2- Department of biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

*Corresponding Author: Jamshidi99@yahoo.com

Abstract

The long-lasting regenerations of sturgeon and their extinction situation depend on the environmental conditions and the nature evolution of these species, which are part of the old ones, and also, the high demand for caviar, which is one of the luxury and expensive products of this species; has led to the reduction of their generation. Different methods have been used for regenerated of these species, among which the usual method is reproduction in breeding environment and release of fry in natural water sources of these species. With the advancement of biological technology and the identification of primordial germ cells, it is possible to isolate cells, track them with molecular markers such as *nanos1*, *vasa* and *dead end*, gene expression or non-molecular markers such as FITC dextran; cultivation and storage of germ stem cells in liquid nitrogen, thawing of cells and use for transplanting to the Recipient animal are presented. Meanwhile, the use of morpholino biotechnology in removing the gene sequence, the main genes involved in the function of Primordial germ cells, as well as the use of gene editing techniques such as CRISPER /CAS9, can provide a suitable way to sterilize the recipient of the transplant fish.

Keywords: Primordial germ cells, *nanos1*, *vasa*, *dead end*, morpholino, CRISPR/CAS9