

تولید موش ناک اوت Spata19 با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9

مهسا زرگر^۱ (M.Sc Student)، عباس جمشیدی زاد^۲ (M.Sc)، آیدین رحیم طایفه^۳ (M.D.V)، احسان هاشمی^۴ (Ph.D Student)، علی نجفی^۱ (Ph.D Student)، مهدی شمس آرا^{۳*} (Ph.D)، محمدحسین مدرسی^{۱*} (Ph.D)
۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- گروه زیست فناوری دامی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۸

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱ ۶۴۰۵۳۲۰۹ Modaresi@tums.ac.ir

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۴۱۳۰۳۵ shamsa@nigeb.ac.ir

چکیده

هدف: ژن *SPATA19* در مراحل تکوینی بیضه و برخی ارگان‌ها بیان دارد، ولی تاکنون عملکرد آن فقط در بیضه بررسی شده است. در این مطالعه با بهره‌گیری از روش CRISPR/Cas9 nickase ضمن تولید موش ناک اوت Spata19 برای مطالعات بعدی در سایر ارگان‌ها، مسیری موثر برای تولید این موش‌ها ارائه دادیم. مواد و روش‌ها: با استفاده از وکتور pX335 و gRNAهای طراحی شده، پلاسمیدهای CRISPR/Cas9 nickase سنتز شدند. هر کدام از پلاسمیدها به باکتری *E. coli* ترانسفورم شدند و انتخاب کلونال انجام شد. پس از استخراج پلاسمیدها از باکتری، به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شدند. مخلوط حاصل به پیش هسته‌ی نر تزریق شد. زیگوت حامل پلاسمید به اویداکت موش فاستر منتقل شد. پس از طی دوران بارداری موش‌های متولد شده مورد آنالیز قرار گرفتند. یافته‌ها: با استفاده از روش CRISPR/Cas9 nickase موش‌های ناک اوت با حذف ۲ نوکلئوتیدی ایجاد کردیم. این حذف در سه سطح DNA، RNA و پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. حذف ۲ نوکلئوتیدی در سطح DNA و RNA به وسیله توالی‌یابی تایید شد. با ترجمه‌ی توالی RNA جهش یافته مشخص شده که این حذف بدون خاتمه زودرس ایجاد می‌کند. در بررسی فنوتیپی نیز عقیم بودن موش‌های هموزیگوت نر (Spata19^{-/-}) تایید شد. نتیجه‌گیری: با تولید موش‌های ناک اوت Spata19 ما یک پروتکل برای تولید موش‌های ناک اوت ارائه می‌دهیم. این موش‌ها می‌تواند به عنوان موش‌های نابارور و برای بررسی ویژگی‌های بیش‌تر ژن Spata19 به کار گرفته شود.

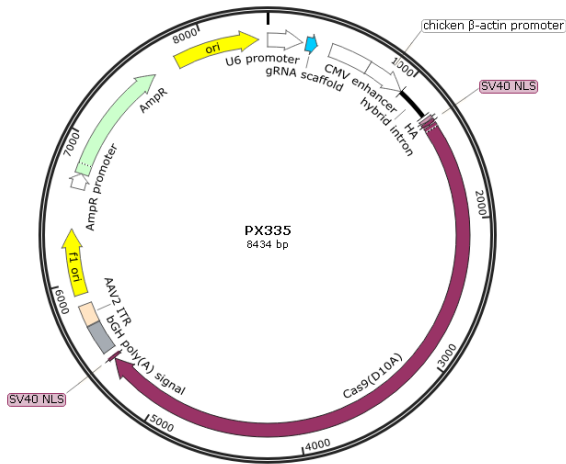
واژه‌های کلیدی: ناک اوت، Spata19، CRISPR/Cas9 nickase، موش؛ اسپرم، pX335

مقدمه

بیماری پارکینسون [۸] مشاهده شده است. هم‌چنین از طریق Ref Seq مشخص شد که SPATA19 علاوه بر بیضه در طی برخی مراحل تکوینی قلب و ریه انسان نیز بیان دارد [۹]. این در حالی است که تاکنون پژوهشی در ارتباط با عملکرد این ژن در ارگان‌هایی غیر از بیضه انجام نشده است. برای شناخت بیشتر عملکرد ژن موش‌های ناک اوت می‌توانند از طریق بروز تغییرات ظاهری، رفتاری، خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی اطلاعاتی را در رابطه با عملکرد ژن ارائه دهند [۱۰]. چندین روش برای تولید چنین موش‌هایی وجود دارد. از این میان به دلیل محدودیت‌هایی که سایر ابزارهای ویرایش ژنی دارند، CRISPR/Cas9 بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است [۱۱]. CRISPR/Cas9 یک مکانیسم دفاع ایمنی اکتسابی در باکتری‌ها و آرکی‌ها است که کلاس، نوع و زیرنوع‌های مختلفی

Spata19 یک ژن ویژه بیضه (Testis specific gene) است که بیان اختصاصی در اسپرماتیدهای هاپلوئید لوله‌های اسپرم‌ساز دارد [۱]. بنابراین بیش‌تر تحقیقات بر روی عملکرد ژن در بیضه انجام می‌شود. این تحقیقات نشان می‌دهد که Spata19 ملکول چسبنده میتوکندریایی است که میتوکندری‌های مجاور را در midpiece اسپرم به یکدیگر متصل می‌کند و همراه با Gpx4 از عوامل حفظ کپسول میتوکندری می‌باشد [۲-۴]. هم‌چنین با تولید موش‌های ناک اوت conditional ژرم سل این ژن مشخص شد که موش‌های هموزیگوت نر به دلیل اختلال حرکت اسپرم ناشی از کاهش ATP عقیم هستند [۵]. در مطالعات دیگر بیان این ژن در سرطان‌های پروستات [۶] و سلول‌های پایه‌ای پوست [۷]، و

همسانه‌سازی اولیگونوکلئوتیدهای رمزکننده gRNA جایگاه برش آنزیم *BbsI* روی این وکتور تعبیه شده است. هم‌چنین به منظور کاستن از off-target ناشی از آنزیم Cas9 در این وکتور از شکل جهش‌یافته این آنزیم استفاده شده است که تحت عنوان Cas9 (D10A) یا nickase شناخته می‌شود.



شکل ۱. نقشه پلاسمید pX335

ژن *Spata19* دو ایزوفرم پروتئینی کد می‌کند که در بخش N - ترمینال با یکدیگر تفاوت دارند. انتهای اولین آگزون مشترک بین دو واریانت پروتئینی و اینترون مجاور آن [۲۷۳۹۷۷۷۹-۲۷۳۹۶۸۰۷] به عنوان نقطه هدف‌گیری ژن انتخاب شد. به منظور شناسایی پلی‌مورفیسم‌های احتمالی که بین نژادهای مختلف موش وجود دارد، DNA موشی استخراج [۱۴] و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده pWT_forward و pWT_reverse (جدول ۱)، نقطه‌ی هدف‌گیری ژن با شرایط ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد تحت گرمایش اولیه انجام شد، در مرحله بعدی ۳۰ سیکل تکثیر (به ترتیب، ۹۴ °C، ۵۶ °C و ۷۲ °C هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه)، پس از آن ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال شد. سپس محصول PCR توالی‌یابی شد. با توجه این‌که Cas9 استفاده شده در وکتور pX335 به صورت nickase است، لذا با استفاده از ابزار طراحی (https://www.atum.bio) دو gRNA به طول ۲۰ نوکلئوتید برای هدف‌گیری ژن طراحی شدند (جدول ۱). gRNA1 روی توالی اینترونی و gRNA2 روی توالی آگزون متصل می‌شدند. بین این دو توالی جایگاه پذیرنده پیرایش (GT) قرار داشت، لذا انتظار می‌رفت پاره‌ای از موتاسیون‌هایی که به صورت تصادفی القا می‌شوند منجر به خارج شدن ژن از فریم صحیح از طریق حذف یا اضافه شدن‌های خارج از ضرب ۳ یا اختلال در پیرایش مولکول mRNA گردند. اولیگونوکلئوتیدهای رمزکننده gRNAها مطابق جدول ۱ طراحی شدند. در ضمن هنگام سنتز، این

دارد [۱۲]. نوعی از کلاس II به نام CRISPR/Cas9 که از باکتری‌های *Streptococcus pyogenes* استخراج می‌شود، در مهندسی ژنوم کاربرد گسترده‌ای دارد. در این باکتری توالی ژنوم مهاجم پس از حمله در میان توالی‌های تکراری لوکوس کریسپر قرار می‌گیرد تا اگر مجدداً در معرض همان عامل مهاجم قرار گرفت، دو RNA کوچک با نام‌های crRNA و tracrRNA تولید کند. crRNA مکمل ژنوم مهاجم است به آن متصل می‌شود. سپس tracrRNA با crRNA هیبرید شده و باعث فراخوانی و فعال کردن نوکلئاز Cas می‌شود. نوکلئاز Cas با شناسایی توالی‌ای به نام PAM سه نوکلئوتید بعد از آن را در سمت ۵' برش می‌زند. و به این طریق شکست دو رشته‌ای ایجاد می‌کند. امروزه برای عملکرد بهتر، tracrRNA و crRNA را به یک‌دیگر متصل کرده و در بین آن توالی PAM را قرار داده‌اند و آن را gRNA می‌نامند [۱۳]. از آنجایی‌که برش دو رشته‌ای می‌تواند از طریق سیستم مستعد خطای NHEJ ترمیم شود، از این روش برای تولید موش‌های ناک اوت مورد نظر استفاده می‌کنند [۱۱]. امروزه برای بهره‌وری موثرتر از این سیستم پیشرفت‌هایی چون بیان هم‌زمان gRNA و Cas9 در یک وکتور و ایجاد فرم جهش‌یافته‌ی Cas9 به نام Cas9 (D10A) nickase شکل گرفته است.

در این پروژه ژن *Spata19* با استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas9 nickase در تمامی سلول‌های موش NMRI که ارتباط نزدیکی از نظر ژنتیکی و فنوتیپی با انسان دارد، غیر فعال شده است تا از این طریق ضمن ارائه‌ی مسیری بهره‌مند از پیشرفت‌های اخیر، از موش‌های ناک اوت تولید شده بتوان در پژوهش‌های بعدی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

موارد اخلاقی و نگهداری موش. تمامی آزمایشات این پروژه بر روی موش‌های NMRI تهیه شده از انستیتوپاستور تهران انجام شد. همه‌ی مراحل آزمایش و روش نگهداری موش‌ها بر اساس قوانین و قوائد کار با حیوانات آزمایشگاهی که توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران منتشر شده است انجام شد. موش‌ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت خاموشی و ۱۲ ساعت روشنایی (ساعت ۵ تا ۱۷) و در دمای ۲۲±۲ °C نگهداری شدند.

طراحی و ساخت سازه‌های ژنی به منظور ناک اوت کردن ژن *Spata19* موشی. وکتور pX335 از شرکت Addgene خریداری شد (شکل ۱). این وکتور به صورت all-in-one طراحی شده و ژن رمزکننده Cas9 و کاست بیان‌کننده guide RNA (gRNA) روی یک وکتور قرار دارند. برای

۱۵۰ داخل لوله‌های ۱/۵ ml تقسیم گردید و برای نگهداری در مدت طولانی به فریزر -۷۰ منتقل شد.

همسانه‌سازی اولیگوهای رمزکننده gRNA در وکتور. یک میکرولیتر (۱۰ pmol/μl) از هر یک اولیگونوکلوئوتیدهای forward و reverse با ۲ μl بافر لیگاسیون X ۱۰ و ۱۶ μl آب مقطر استریل مخلوط شده و در دستگاه ترموسایکلر (ABI Veriti gradient PCR machine) قرار داده شد. دمای دستگاه از ۹۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد با شیب کاهشی ۰/۱ درجه در هر ثانیه تنظیم شد. پس از اتمام مرحله هیبریداسیون، ۱ میکرولیتر از مخلوط هیبریداسیون در ۱۹۹ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز رقیق شد تا در واکنش لیگاسیون با وکتور مورد استفاده قرار گیرد. جهت وارد نمودن الیگونوکلوئوتیدهای هیبرید شده به داخل وکتور pX335، ۱ μg از وکتور با ۰/۵ μl آنزیم BbsI (۱۰ IU/μl) و ۱ μl بافر Tango (۱۰X) مخلوط شده و با آب مقطر استریل به حجم ۱۰ μl رسانده شد. سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد. جهت اطمینان از هضم آنزیمی، پلاسمید هضم شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.

به منظور جلوگیری از اتصال انتهای چسبیده به یکدیگر، وکتور در انتهای ۵' با آنزیم آلکالین فسفاتاز دفسفریله شد. برای دفسفریله کردن، ابتدا آنزیم BbsI در دمای ۶۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد. سپس ۲ μl آنزیم آلکالین فسفاتاز (IU/μl) (۱) و ۲ μl بافر آلکالین فسفاتاز به واکنش هضم آنزیمی اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۰ μl رسید. واکنش آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. در آخر غیرفعال کردن آلکالین فسفاتاز در حرارت ۶۵ °C به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

اولیگونوکلوئوتیدها در انتهای ۵' خود فسفریله شدند. با توجه به این‌که وجود یک نوکلئوتید G در ابتدای توالی gRNA باعث بهبود کارایی رونوشت‌برداری از پروموتور U6 می‌شود، لذا یک نوکلئوتید G به ابتدای توالی gRNA ها اضافه شد. هم‌چنین برای همسانه‌سازی توالی‌های رمزکننده gRNA در جایگاه آنزیمی BbsI در پلاسمید pX335، توالی‌های 5'-AAAC و 5'-CACC به انتهای 5' اولیگونوکلوئوتیدهای forward و reverse به ترتیب اضافه شدند (جدول ۱).

تهیه سلول مستعد *E. coli* به روش کلسیم کلرید. یک تک کلونی از باکتری *E. coli* سویه DH5α در ۱۰ ml محیط LB مایع به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ °C و دور ۱۸۰ rpm کشت داده شد. کشت شبانه تا غلظت (v/v) ۱٪ در ۱۰۰ ml در محیط کشت LB تازه تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط قبل قرار گرفت تا جذب نوری به ۶۰۰ nm به حدود ۰/۴ رسید. کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد تا رشد باکتری‌ها در مرحله‌ی رشد لگاریتمی متوقف شود. کشت در داخل فالكون‌های استریل تقسیم شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C و سرعت ۱۳۰۰۰ xg سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و فالكون به صورت برعکس روی دستمال آغشته به الکل قرار داده شد تا محیط به طور کامل خارج شود. ۲۵ ml محلول CaCl₂ سرد با غلظت ۱۰۰ mM به رسوب باکتری افزوده شد و رسوب به آرامی سوسپانسیون گردید. فالكون به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ نگهداری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C و سرعت ۳۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری در ۳ ml محلول CaCl₂ سرد حاوی ۱۵٪ گلیسرول سوسپانسیون شد و در مقادیر μl

جدول ۱. توالی‌های gRNA و پرایمر طراحی شده علیه ژن *Spata19*

	الیگونوکلوئوتید	(5'→3') توالی
gRNA 1	gR1 _ forward gR1 _ reverse	5'-aacagagtttgtgaaagt 5'-CACCGaacagagtttgtgaaagt 5'-AAACactttcacacaaactctgttC
gRNA 2	gR2 _ forward gR2 _ reverse	5'-cacatgtatgtcatgctccat 5'-CACCGcacatgtatgtcatgctccat 5'-AAACatggacatgacatacatgtgC
ال جهش یافته	pMu _ forward p _ reverse	5'-catggacatgacatacatgtgacctgat 5'-gtggacatctgtgctggga
ال وحشی	pWT _ forward p _ reverse	5'-catggacatgacatacatgtgacctgat 5'-gtggacatctgtgctggga
تکثیر ناحیه مورد هدف در موش وحشی	pWT _ forward pWT _ reverse	5'-catggacatgacatacatgtgacctgat 5'-ccaggcaccatacctccat
RT-PCR	SpaRT-F SpaRT-R	5'-ctcggagcataaggagaag 5'-catgagatgagatgcttctgC

داخل صفاقی ۱۰IU هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی (داروپخش) القا شد. پس از تزریق، موش‌های ماده بلافاصله با موش‌های نر نژاد NMRI به نسبت ۱:۱ جفت اندازی شدند. صبح روز بعد (روز چهارم) موفقیت آمیز بودن جفت‌گیری با بررسی وجود پلاک واژنی تایید شد. هم‌زمان موش‌های مادر جایگزین (Foster mother) (ترجیحاً ۸ هفته به بالا و وزن حدود ۴۰ گرم) با موش‌های نر وازکتومی شده جفت اندازی شدند تا در مرحله انتقال جنین مورد استفاده قرار گیرند. موفقیت آمیز بودن جفت‌گیری در صبح روز بعد با بررسی پلاک‌های واژنی تایید شد.

موش‌های دهنده‌ی اووسیت آماده شده در مرحله‌ی قبل با استفاده از جابه‌جایی گردن کشته شدند. سپس با استفاده از پنس و قیچی استریل پوست و پرده صفاق ناحیه شکم شکافته شد تا جایی که اندام‌های درون شکم مشاهده شود. لایه‌های چربی و رگ‌های اطراف اویداکت با استفاده از پنس ریز جدا شده و سپس اویداکت با استفاده از یک قیچی کوچک جدا شد. اویداکت جدا شده ابتدا در پلیت ۳۵ میلی‌متری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط M2 با دمای ۳۷°C شسته شد و سپس به پلیت M2 جدید منتقل گردید. اویداکت‌ها به زیر استریومیکروسکوپ منتقل شد و آمپولا توسط دو پنس ظریف پاره شد. اووسیت‌ها همراه با سلول‌های کومولوس به داخل محیط آزاد شدند. جهت جدا کردن سلول‌های کومولوس از اووسیت‌ها آنزیم هیالورونیداز در غلظت نهایی ۰/۳-۰/۵ mg/ml به محیط حاوی اووسیت‌ها اضافه شده و ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. در یک پلیت ۳ میلی‌متری چهار قطره (هر کدام ۱۰۰ μl) از محیط M2 گذاشته شد و برای ممانعت از تبخیر شدن قطرات در هنگام کار در زیر میکروسکوپ سطح آن را کاملاً با روغن معدنی پوشانده و داخل انکوباتور ۳۷°C نگهداری شدند. اووسیت‌های جدا شده با استفاده از پیپت دهانی در داخل قطره‌ی اول شسته شده و به ترتیب در قطرات بعدی ادامه داده شد تا در قطره‌های آخر جنین‌های سالم و عاری از سلول‌های کومولوس جمع‌آوری شدند. در پلیت ۳ میلی‌متری دیگری چهار قطره ۲۵ μl از محیط M16 ریخته شد و سطح آن با روغن معدنی پوشانده شد و داخل انکوباتور CO₂ دار قرار گرفت. جنین‌های شسته شده به قطرات محیط M16 منتقل شد و تا شروع تزریق در انکوباتور CO₂ دار نگهداری شد.

وکتورهای نوترکیب هر یک در غلظت ۲ نانوگرم بافر تزریق به جنین (Millipore) آماده شدن و با نسبت حجمی مساوی در یک میکروتیوب استریل با هم مخلوط شدند. میکروتیوب حاوی این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C و با سرعت ۱۰۰۰ xg سانتریفوژ شد. سپس ۲۰ μl از

وکتور خطی شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. سپس با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) و طبق پروتکل شرکت سازنده‌اش وکتور خطی شده خالص‌سازی شد. برای آماده‌سازی واکنش لیگاسیون، ۱ μl وکتور خطی pX335 با ۹ μl اولیگونوکلوئوتیدهای هیبرید شده، ۱/۵ μl آنزیم T4 DNA ligase (۵ U/μl)، ۱/۵ μl بافر T4 DNA ligase (۱۰X) و ۱ μl پلی اتیلن گلیکول ۵۰٪ مخلوط شده و واکنش لیگاسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲°C و ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه ادامه یافت. به منظور کنترل self-ligation واکنش لیگاسیون در غیاب الیگونوکلوئوتیدها نیز انجام شد.

ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون به باکتری و شناسایی باکتری‌های حامل وکتور pX335 نوترکیب. محصول لیگاسیون به باکتری *E. coli* سویه DH5α که پیش‌تر به روش شیمیایی کلسیم کلرید مستعد شده بود، به روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. ابتدا میکروتیوب حاوی باکتری مستعد از فریزر ۷۰°C- خارج شده و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد از حالت انجماد خارج شود. ۱۰ μl از محلول لیگاسیون تحت شرایط استریل به ۱۰۰ μl باکتری مستعد اضافه شد و با ضربات آرام مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، میکروتیوب به مدت ۹۰ ثانیه تحت شوک حرارتی در حمام آب ۴۲°C قرار گرفت و سپس بلافاصله روی یخ منتقل شد و ۲ دقیقه روی آن انکوبه شد. ۱ ml محیط کشت LB بدن آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب افزوده شد و یک ساعت در انکوباتور شبیکردار C ۳۷°C و دور ۱۸۰ rpm نگهداری شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری در ۱۰۰ μl LB مایع سوسپانسیون شده و روی پلیت LB حاوی ۱۰۰ μg/ml آمپی‌سیلین پخش شد. برای ظهور کلونی‌ها، پلیت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. سپس با استفاده از کیت High Pure Plasmid Extraction (Roche) و پروتکل شرکت سازنده‌اش از باکتری‌های رشد کرده روی پلیت آمپی‌سیلین، پلاسمیدها استخراج و تعیین توالی شدند.

تولید موش‌های موتانت از طریق ریز-تزریق به زیگوت. به منظور تزریق پلاسمیدها به زیگوت موش، ابتدا وکتورهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید عاری از آندوتوکسین شرکت Qiagen و پروتکل شرکت سازنده‌اش استخراج شدند. سپس به منظور سوپراوولاسیون، روز اول (ساعت ۱۴:۳۰) به ۱۰ موش ماده نژاد NMRI ۴ هفته‌ای ۱۰ IU هورمون گنادوتروپین سرم مادبان باردار (PMSG; Hypra) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. روز سوم (ساعت ۱۳:۳۰) تخمک‌گذاری موش‌های ماده با تزریق

تحت گرمایش اولیه انجام شد، در مرحله بعدی ۳۰ سیکل تکثیر (به ترتیب، ۹۴ °C، ۵۶ °C و ۷۲ °C هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه)، پس از آن ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند. محصولات PCR پس از توالی‌یابی برای بررسی جهش در ناحیه هدف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

پس از بررسی‌های DNA ژنومی در صورت نیاز از موش‌ها بیویسی بیضه تهیه می‌شد و بعد از استخراج RNA کل، واکنش RT-PCR انجام می‌شد. برای استخراج RNA از کیت YTzol pure RNA (شرکت یکتا تجهیز گستر) و طبق پروتکل شرکت سازنده‌اش انجام شد. به منظور انجام RT-PCR ابتدا واکنش ساخت رشته‌ی اول cDNA از روی RNA استخراج شده از بیضه انجام شد. برای این کار از کیت cDNA synthesis kit (شرکت یکتا تجهیز گستر) و پروتکل شرکت سازنده‌اش استفاده گردید. پس از تهیه‌ی cDNA واکنش PCR با پرایمرهای SpaRT-R SpaRT-F و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ پیکومول از هر پرایمر، میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Polymerase Master Mix Red (Amplicon) و آب عاری از نوکلئاز تهیه شد و چرخه‌های حرارتی با شرایط ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد تحت گرمایش اولیه انجام شد، در مرحله بعدی ۵ سیکل تکثیر (به ترتیب، ۹۴ °C، ۵۷ °C و ۷۲ °C هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه) و ۳۰ سیکل تکثیر (به ترتیب، ۹۴ °C، ۶۰ °C و ۷۲ °C هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه) پس از آن ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال شد.

نتایج

مقایسه توالی موش‌های NMRI با توالی موجود در NCBI چنانچه پیش‌تر اشاره شده برای اجتناب از پلی‌مرفیسم‌های ژنتیکی که می‌توانست اتصال gRNAها به توالی هدف و در نهایت روی کارایی ویرایش ژنوم توسط سیستم CRISPR تاثیر بگذارد، برای طرفین جایگاهی که gRNAها برای آن طراحی شده بودند پرایمر طراحی شد. نتیجه تکثیر یک باند ۴۲۶ جفت بازی بود که برای تعیین سکانس ارسال شد. نتیجه توالی‌یابی اختلافی بین لکوس ژن *Spata19* در موش‌های NMRI و سکانس گزارش شده در NCBI نشان نداد.

همسانه‌سازی اولیگونوکلوئوتیدهای رمزکننده gRNAها درون ناقل pX335 برای این‌کار ابتدا وکتور pX335 از باکتری *E. coli* استخراج شد و با آنزیم *BbsI* هضم گردید (شکل ۲-ا). در ادامه پس از دفسفریله کردن پلاسمید خطی شده و نیز لیگاسیون آن با قطعات اولیگونوکلوئوتیدی هیبرید شده، محصول لیگاسیون به باکتری ترانسفورم شد و پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده استخراج شد.

روی محلول جهت ریز تزریقی برداشته شد و به یک میکروتیوب جدید منتقل شد.

یک قطره ۲۰ μl از محیط M2 در مرکز یک پلیت ۳۵ میلی‌متری گذاشته شده و سطح آن با روغن معدنی پوشانده شد. ۲۵-۲۰ جنین به قطره M2 منتقل شد و پلیت زیر میکروسکوپ قرار گرفت. DNA آماده شده از مراحل قبل به روش پر کردن از پشت به درون سلول ریز تزریقی بارگذاری شد. بیپت نگه‌دارنده به سل ترام هوا و سوزن تزریق به سل ترام روغن متصل شدند و هر دو در قطره M2 قرار گرفتند. جنین به کمک پیپ نگه‌دارنده و با یک مکش کوچک ثابت شد. پیش‌هسته‌ی نر در موقعیت مناسب قرار گرفت و وضوح میکروسکوپ روی پیش‌هسته‌ی نر تنظیم شد. پس از تزریق سوزن، تزریق به درون پیش‌هسته‌ی نر انجام شد. بزرگ شدن پیش‌هسته علامت موفقیت‌آمیز بودن تزریق بود. پس از اتمام تزریق، جنین‌ها به قطره M16 منتقل شده و تا زمان انتقال در انکوباتور CO₂ دار نگهداری شد.

اوسیت‌های تزریق شده به محیط M2 منتقل شده و پس از شستشو در آن به وسیله یک پیپت انتقال جمع شدند. برای مشاهده موفقیت‌آمیز بودن انتقال به اویداکت همراه با اوسیت‌ها حباب‌های هوا هم در داخل پیپ کشیده شد. یک موش NMRI باردار کاذب با تزریق محلول کتامین/زایلازین بی‌هوش شد (به ازای هر ۱۰ گرم وزن موش ۰/۱ ml داروی بی‌هوشی تزریق گردید) و موهای ناحیه پشت تراشیده شده و سطح پوست با اتانول ۷۰٪ شد. با استفاده از پنس و قیچی شکافی به طول ۱ سانتی‌متر در پوست و عضلات ناحیه پشت ایجاد شد و تخمدان با استفاده از بافت چربی متصل به آن خارج گردید. بعد از ثابت کردن تخمدان، موش به زیر استریومیکروسکوپ منتقل شد. با استفاده از دو پنس ظریف بورسا (پرده احاطه‌کننده اویداکت) پاره شد و با پیدا کردن اینفاندیبولوم (ابتدای لوله‌های اویداکت) زیگوت‌های تزریق شده به داخل اویداکت تخلیه شدند. حدود ۳۵-۳۰ زیگوت تزریق شده به اویداکت هر موش پذیرا منتقل شد. تخمدان به آرامی به داخل بدن برگردانده شد و محل برش بخیه زده شد. موش پذیرا به قفس منتقل شد و تا زمان زایمان در حیوان خانگی نگهداری شد.

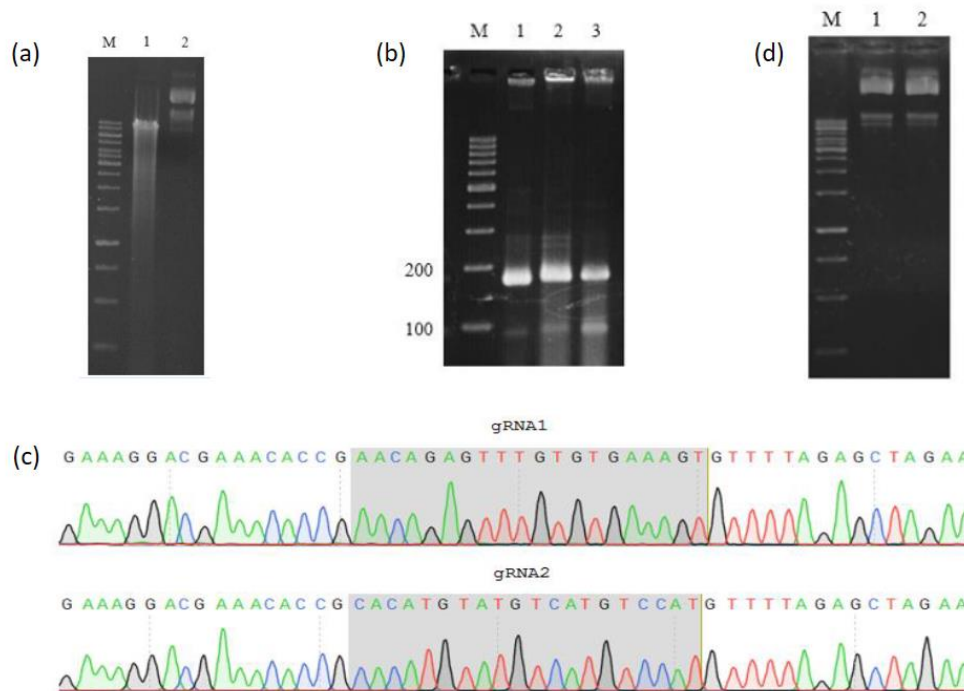
غربالگری موش‌های هدف. موش‌های حاصل از جنین‌های ریز تزریق شده برای آنالیز و بررسی وجود جهش مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور DNA ژنومی موش‌های متولد شده در سن ۳-۲ هفته‌ای از بیویسی انگشت استخراج شد [۱۴] و طرفین محل مورد هدف gRNA روی ژنوم موش با استفاده از پرایمرهای طراحی شده pWT_forward و pWT_reverse (جدول ۱) با شرایط ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

با توجه به کوچک بودن قطعات نتیجه کلونینگ با این پرایمرها که روی وکتور قرار می‌گرفتند تکثیر شد. این پرایمرها از وکتور خالی قطعات ۸۷ و ۱۶۹ جفت بازی را تکثیر می‌کردند و در صورت نوترکیب بودن کم‌تر از ۲۰ جفت‌باز به طول این قطعات اضافه می‌شد (شکل ۲-ب). چنانچه مشاهده می‌شود اندازه باندها در ردیف‌های ۲ و ۳ کمی بزرگ‌تر از ردیف ۱ است. سپس کلون‌هایی که محصول PCR آن سنگین‌تر بود برای تعیین توالی ارسال شدند. نتیجه سکانس، وجود توالی اولیگومری رمزکننده gRNA1 و gRNA2 در وکتور pX335 پس از توالی‌یابی تایید شد (شکل ۲-ج). پلاسمیدهای نوترکیب حاصل gRNAها از *E. coli* به روش endotoxin free استخراج شده (شکل ۲-د) و برای ریزتزریقی آماده شدند.

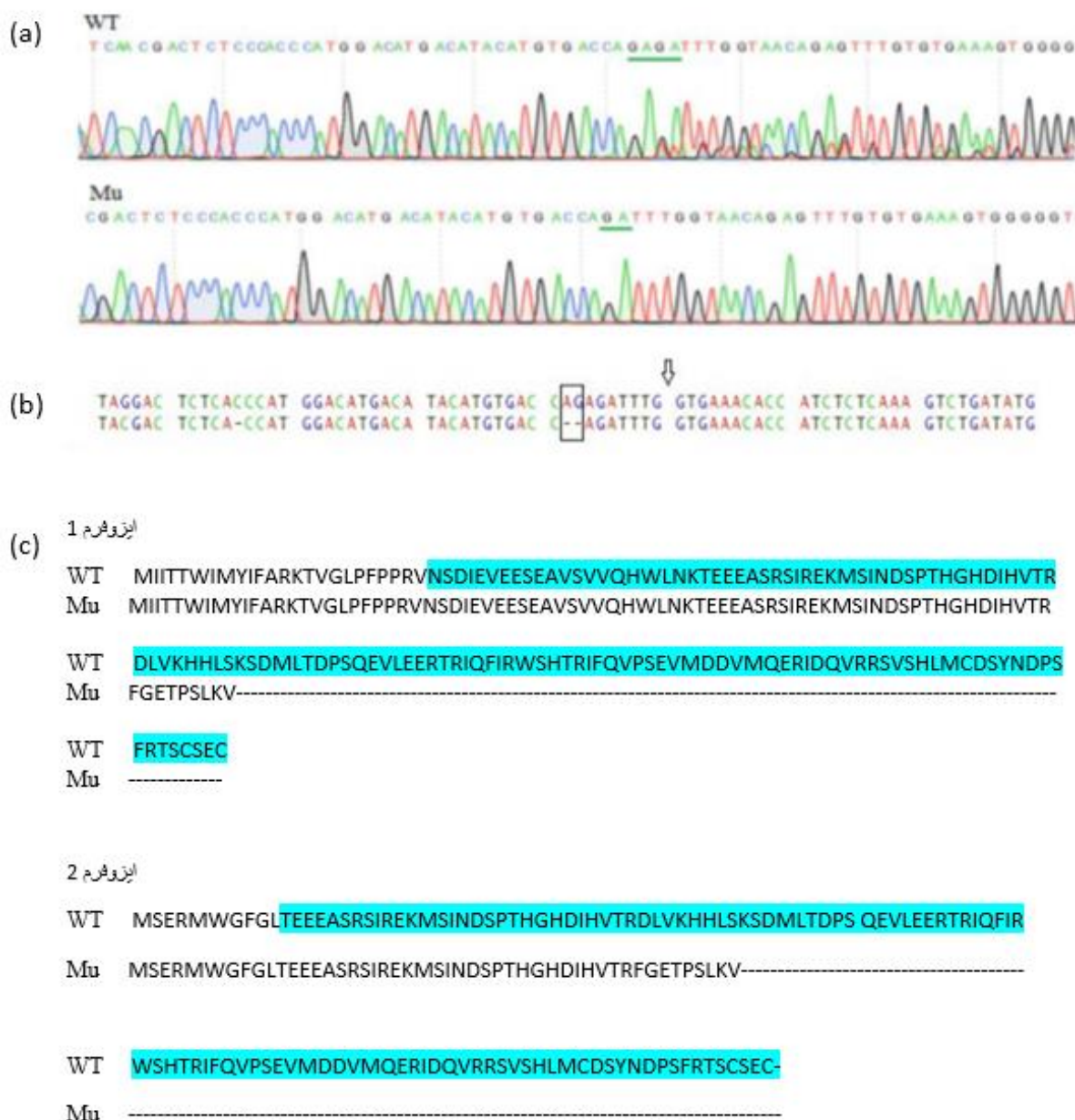
آنالیز موش‌های حاصل

با بررسی ۲۶ موش حاصل از ریزتزریق‌ها به یک موش دارای جهش دو جفت بازی رسیدیم که در ناحیه اگزون ژن

هم‌چنین از بافت بیضه موش نر هموزیگوت RNA استخراج شد و با توالی‌یابی آن وجود حذف دو تایی در اگزون Spata19 تایید شد. چون این حذف در اگزون بوده و به صورت دوتایی می‌باشد، منجر به خارج شدن ادامه توالی آن از چارچوب سه تایی می‌گردد (شکل ۳-ب). در ترجمه‌ی رونوشت‌های موتانت و وحشی پیش‌بینی شد که هر دو رونوشت در ابتدای خود کدون خاتمه‌ی زودس خواهند داشت (شکل ۳-ج). در انتها موش با حذف ۲ نوکلئوتید با ۵ موش وحشی ماده به طور جداگانه آمیزش داده شد که با وجود ایجاد واژینال پلاک باروری صورت نگرفت.



شکل ۲. همسانه سازی اولیگونوکلئوتیدهای رمزکننده gRNAها درون ناقل pX335. (a) محصول هضم انزیمی وکتور pX335. M نشانگر وزن ملکولی DNA (1kb)، ۱ پلاسمید خطی شده با آنزیم *BbsI* و دو پلاسمید هضم نشده. (b) PCR برای تعیین کلونینگ الیگومرها در پلاسمید pX335. M نشانگر وزن ملکولی DNA (100 bp)، ۱ باند تکثیر شده از روی پلاسمید pX335، ۲ و ۳ به ترتیب باندهای تکثیر شده از روی پلاسمید نوترکیب pX335/gRNA1 و pX335/gRNA2. (c) تایید همسانه سازی قطعات الیگومری رمزکننده gRNA1 و gRNA2 در پلاسمید pX335 با تعیین توالی. (d) پلاسمیدهای نوترکیب pX335 حامل قطعات الیگونوکلئوتیدی رمزکننده gRNA1 و gRNA2. M نشانگر وزن ملکولی DNA (1 kb)، ۱ پلاسمید pX335/gRNA1، ۲ پلاسمید pX335/gRNA2.



شکل ۳. (a) مقایسه توالی ژن *Spata19* در محل وقوع جهش در موش تیپ وحشی و جهش یافته. چنانچه مشاهده می شود حذف دو نوکلئوتید GA در موش جهش یافته اتفاق افتاده است (در شکل با خط سبز نشان داده شده است)، به گونه ای که توالی GAGA در موش تیپ وحشی به GA در موش های موتانت تبدیل شده است. (b) در تعیین توالی رونوشت ژن *Spata19* از موش تیپ وحشی و موتانت یک حذف ۲ نوکلئوتیدی GA را نشان داد. حذف ۲ نوکلئوتیدی در مستطیل نشان داده شده است. فلش محل اتصال محل اتصال آگزون ها را نشان می دهد. (c) ترجمه ی رونوشت های موش موتانت و وحشی نشان داد که حذف دو نوکلئوتیدی باعث کدون خاتمه ی زودرس در هر دو رونوشت می شود. قسمت های آبی رنگ نشان دهنده ی دومین هر کدام از ایزوفرم ها است.

از جمله سرطان سلول های پایه ای پوست [۷] و سرطان پروستات [۶] که یکی از شایع ترین سرطان ها محسوب می شود دیده شده است. همه ی این ها به اهمیت عملکرد این ژن در مراحل تکوینی و بیماری هایی چون سرطان اشاره می کند، در حالی که در ارتباط با این ژن تاکنون تنها ۱۱ مقاله منتشر شده و نقش *Spata19* خیلی کم تر از آنچه که باید شناخته شده است. یکی از راه های شناخت عملکرد چنین ژن هایی تولید حیوانات ناک اوت آن ژن است تا با مشاهده ی تغییرات آناتومیک، فیزیولوژیک و هیستولوژیک اطلاعات ارزشمندی

بحث و نتیجه گیری

SPATA19 یک ژن ویژه بیضه است. در سال ۲۰۰۳ Miyamoto و همکاران بیان این ژن را به روش nested RT-PCR در برخی از ارگان های انسان از جمله قلب و ریه بررسی کردند و مدعی شدند که این ژن تنها در بیضه بیان دارد [۱۵]. این در حالی است که RNA seq انجام شده در مراحل تکوین جنین انسان نشان داد که این ژن در هفته های ۱۱، ۱۷، ۱۸ و ۲۰ در قلب و در هفته های ۱۰ و ۲۰ در ریه بیان می شود [۹]. هم چنین بیان این ژن در پارکینسون [۸] و برخی از سرطان ها

است که مراحل تولید این موش‌ها را ساده‌تر و در مدت زمان کم‌تر ممکن می‌سازد.

ویرایش ژنوم از طریق وارد کردن شکست‌های دو رشته‌ای در DNA می‌تواند به وسیله‌ی نوکلئازهای انگشت روی و افکتورهای شبه فعال‌کننده‌ی رونویسی انجام شود. در این دو روش از پروتئین‌های سنتزی که از ادغام اندونوکلاز FokI و دومین شناسایی DNA به وجود آمده‌اند استفاده می‌شود. این آنزیم‌ها توالی DNA را از طریق تعامل پروتئین-DNA شناسایی می‌کند و اندونوکلاز FokI از طریق فعالیت اندونوکلازی یک برش دو رشته‌ای در ژنوم هدف ایجاد می‌کند. از آنجایی که طراحی و آماده‌سازی دومین تشخیص DNA کاری سخت بود و لازم بود برای هر ژن مورد هدف پروتئین متفاوت تولید شود، استفاده از این روش‌ها محدود شد. اما در روش کریسپر به دلیل استفاده از RNA برای شناسایی هدف به جای پروتئین روش اختصاصی‌تر، ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر محسوب می‌شود [۱۸].

سیستم کریسپر فاقد بسیاری از محدودیت‌هایی است که مگالونوکلازها، TALENs و ZFNs با آن مواجه هستند. به همین دلیل امروزه این روش برای تولید موش‌های ناک اوت بسیار مورد توجه بوده است. برای مثال سال ۲۰۱۹ شیرکو ناصری و همکاران برای تولید موش‌های ناک اوت Fam83h به طور خلاصه saRNAها را به روش overlap PCR آماده کردند و پس از مخلوط کردن با Cas9 RNA به زیگوت موش تزریق کردند [۱۹]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۸ Lee و همکاران پس از سنتز saRNAها و mRNAها، آن‌ها را به زیگوت موش نر وارد کردند [۲۰]. پیشرفت‌های مهمی در استفاده از این سیستم شکل گرفته که از آن جمله می‌توان به انتقال DNA به جای RNA به زیگوت برای ویرایش ژنوم که نیاز به آماده‌سازی و مراقبت بیش‌تر را کاهش می‌دهد اشاره نمود [۱۸]. دیگر بیان هم‌زمان saRNAها و نوکلئاز Cas9 توسط یک وکتور و کاهش برش‌های غیر اختصاصی توسط Cas9 جهش‌یافته به نام Cas9 nickase (D10A) می‌باشد. در این پروژه به منظور بهره‌گیری هم‌زمان از پیشرفت‌های اخیر از وکتور px335 استفاده شد.

موش‌های ناک اوت تولید شده دارای حذف ۲ نوکلئوتیدی خارج از چارچوب در موقعیت [۲۷۳۹۷۷۸۸-۲۷۳۹۷۷۸۹] می‌باشند. ژن *Spata19* دو رونوشت در موش دارد که تفاوت دو رونوشت در ۳ اگزون ابتدایی می‌باشد. موقعیت نوکلئوتیدهای حذف شده بر روی اگزون چهار ژنومی که اولین اگزون مشترک در رونوشت‌ها را تشکیل می‌دهد ایجاد شده است. بنابراین این حذف هر دو نوع رونوشت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. دومین ایزوفرم‌های ۱ و ۲ به ترتیب در موقعیت‌های اسیدآمینهای

در رابطه با عملکرد ژن به‌دست آوریم [۱۶]. در این میان موش‌ها به دلیل شباهت بسیار زیاد ژنتیکی به انسان، به لحاظ تعداد ژن‌ها، وجود ژن‌های ارتولوگ، اتمام پروژه ژنوم موش، توسعه‌ی تکنیک‌های کمک باروری و دست‌ورزی جنین در موش، فاصله نسبتاً کوتاه بین نسل‌ها، تعداد مناسب فرزندان در هر نسل، نگهداری آسان و ارزان‌قیمت و هم‌چنین وجود سویه‌های هم خون و غیر هم خون، یک حیوان مدل مناسب برای بسیاری از دست‌ورزی‌های ژنتیکی هستند [۱۷]. اگر چه در سال ۲۰۱۵ Mi و همکاران موش ناک اوت Spata19 را با روش فناوری نو ترکیبی همولوگ (homologous recombination technology) ایجاد کردند، اما این موش‌های تولید شده، ناک اوت conditional سلول‌های ژرم سل هستند و اطلاعاتی در رابطه با عملکرد ژن در سایر ارگان‌ها غیر از ژرم سل ارائه نمی‌دهند [۵]. بنابراین در این پروژه ما موش‌های ناک اوت کلی (Global) Spata19 با روش نوین CRISPR/Cas9 nickase ایجاد کردیم تا ضمن ایجاد مدل حیوانی برای بررسی عملکرد ژن *Spata19*، در سایر ارگان‌ها در مطالعات آینده، مسیری برای تولید موش‌های ناک اوت بعدی ارائه دهیم.

در روش معمول تولید موش‌های ناک اوت قطعه‌ی DNA طراحی می‌شود که در دو سمت آن توالی همولوگ توالی‌های دو سمت ناحیه‌ی مورد نظری که قرار است حذف شود وجود دارد. به این قطعه به اصطلاح وکتور هدف‌گیر (Targeting Vector) می‌گویند. این قطعه با الکتروپوریشن وارد سلول‌های بنیادی جنین (Embryonic Stem Cell) می‌شود تا از طریق نو ترکیبی همولوگ جایگزین قطعه‌ی مورد نظر در ژنوم شود [۱۶]. پس از انجام فرآیند انتخاب مثبت با استفاده از آنتی‌بیوتیک G418 و انتخاب منفی با گان‌سیکلوویر، کلونی‌های رشد کرده‌ی سلول‌های بنیادی جنین برداشته شده و پس از کشت مجزا به لحاظ جایگزینی صحیح قطعه‌ی DNA هدف با PCR بررسی می‌شوند. آن دسته از کلون‌هایی که در آن‌ها ژن مورد نظر هدف‌گیری شده‌اند، کشت شده و به درون بلاستوسیت موش تزریق می‌شود تا موش‌های کایمر به‌دست آیند. به منظور بررسی انتقال صفت از طریق سلول‌های جنسی، موش‌های کایمر با موش‌های وحشی آمیزش داده می‌شوند و حضور الل موتان یافته را در فرزندان نسل اول بررسی می‌کنند [۱۷]. امروزه روش‌های دیگری بر مبنای نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی مانند نوکلئازهای انگشت روی (Zinc finger nuclease (ZFNs)، افکتورهای شبه فعال‌کننده‌ی رونویسی (Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) و CRISPR/Cas برای ساخت جنین موش‌هایی به کار گرفته شده

[2] Doiguchi M, Yamashita H, Ichinose J, Mori T, Shibata Y, Iida H. Complementary DNA cloning and characterization of rat spergen-1, a spermatogenic cell-specific gene-1, containing a mitochondria-targeting signal. *Biol Reprod* 2002; 66: 1462-1470.

[3] Babatunde KA, Najafi A, Salehipour P, Modarressi MH, Mobasher MB. Cancer/Testis genes in relation to sperm biology and function. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20: 967-974.

[4] Suzuki-Toyota F, Ito C, Toyama Y, Maekawa M, Yao R, Noda T, et al. Factors maintaining normal sperm tail structure during epididymal maturation studied in *Gopc^{-/-}* mice. *Biol Reprod* 2007; 77: 71-82.

[5] Mi Y, Shi Z, Li J. Spata19 is critical for sperm mitochondrial function and male fertility. *Mol Reprod Dev* 2015; 82: 907-913.

[6] Ghafouri-Fard S, Ousati Ashtiani Z, Sabah Golian B, Hasheminasab SM, Modarressi MH. Expression of two testis-specific genes, SPATA19 and LEMD1, in prostate cancer. *Arch Med Res* 2010; 41: 195-200.

[7] Ghafouri-Fard S, Abbasi A, Moslehi H, Faramarzi N, Taba Taba Vakili S, Mobasher MB, Modarressi MH. Elevated expression levels of testis-specific genes TEX101 and SPATA19 in basal cell carcinoma and their correlation with clinical and pathological features. *Br J Dermatol* 2010; 162: 772-779.

[8] Jansen IE, Gibbs JR, Nalls MA, Price TR, Lubbe S, van Rooij J, et al. Establishing the role of rare coding variants in known Parkinson's disease risk loci. *Neurobiol Aging* 2017; 59: 220. e11-220.

[9] Szabo L, Morey R, Palpant NJ, Wang PL, Afari N, Jiang C, et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol* 2015; 16: 126.

[10] Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol* 2009; 44: 19.12. 1-19.12.17.

[11] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157: 1262-1278.

[12] Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2019; 374: 20180087.

[13] Eskandarian Boroujeni M. Genetically modified mice - Methods, applications and outlook. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2019; 24: 24-44.

[14] Zangala T. Isolation of genomic DNA from mouse tails. *J Vis Exp* 2007; 6: e246.

[15] Miyamoto T, Sengoku K, Hasuike S, Takuma N, Hayashi H, Yamashita T, Ishikawa M. Isolation and expression analysis of the human testis-specific gene, SPERGEN-1, a spermatogenic cell-specific gene-1. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 101-104.

[16] Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, et al. The knockout mouse project. *Nature Genet* 2004; 36: 921.

[17] Sosa MG, De Gasperi R, Elder GA. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct* 2010; 214: 91-109.

[18] Fujihara Y, Ikawa M. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection, in *Methods in enzymology*. *Methods Enzymol* 2014; 546: 319-336.

[19] Nasser S, Nikkho B, Parsa S, Ebadifar A, Soleimani F, Rahimi K, et al. Generation of Fam83h knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene engineering. *J Cell Biochem* 2019; 120: 11033-11043.

[20] Lee H, Kim JI, Park JS, Roh JI, Lee J, Kang BC, Lee HW. CRISPR/Cas9-mediated generation of a Plac8 knockout mouse model. *Lab Anim Res* 2018; 34: 279-287.

۲۵ → ۱۵۴ و ۱۱ → ۱۱۹ قرار دارند. بنابراین حذف دو نوکلئوتیدی می‌تواند باعث کدون خاتمه‌ی زودتر از موعد در ابتدای دومین پروتئینی و در نتیجه غیرفعال کردن هر دو ایزوفرم می‌شود (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/75469>). طبق آمیزش‌های انجام شده بین موش‌های هموزیگوت نر و موش‌های وحشی مشخص شد موش‌های هموزیگوت نر عقیم بودند. این نتیجه با گزارشات قبلی هم‌خوانی داشت [۵]. همه‌ی این‌ها نشان داد که با استفاده از CRISPR/Cas9 nickase *Spata19* کاملاً غیر فعال شده است.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با روش به کار برده شده به طور موثرتر و آسان‌تر از روش‌های قبلی می‌توان موش‌های ناک اوت ایجاد کرد. چرا که در این پروژه از وکتور pX335 استفاده شده که علاوه بر ایجاد امکان بیان هم‌زمان Cas9 و gRNA، با دارا بودن فرم جهش یافته‌ی Cas9 امکان برش‌های غیر تخصصی را به شدت کاهش می‌دهد. همچنین موش‌های ناک اوت کلی *Spata19* می‌توانند امکان بررسی عملکرد ژن مورد نظر را در سایر ارگان‌ها فراهم می‌کند. از دیگر کاربردهای آن این است که این مدل حیوانی می‌تواند در مطالعات جنین‌شناسی، ناباروری و سرطان به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی انواع رونوشت‌های ژن *Spata19* در موش سالم و مقایسه‌ی آن با موش هموزیگوت ناک اوت شده" مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۶ با کد ۱۰۴ می‌باشد که با همکاری و مساعدت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری دامی انجام شده است. در انتها لازم به ذکر است که در این پروژه جناب آقای عباس جمشیدی‌زاد نیز به اندازه نویسنده اول در اجرای این پروژه سهم بوده‌اند.

منابع

[1] Nourashrafeddin S, Ebrahimzadeh-Vesal R, Miryounesi M, Aarabi M, Zarghami N, Modarressi MH, Nouri M. Analysis of SPATA 19 gene expression during male germ cells development, lessons from in vivo and in vitro study. *Cell Biol Int Rep* 2014; 21: 1-7.

Generation of global Spata19 knockout mouse using CRISPR/Cas9 nickase technology

Mahsa Zargar (M.Sc Student)¹, Abbas Jamshidzad (M.Sc)², Aidin Rahim-Tayefeh (M.D.V)², Ehsan Hashemi (Ph.D Student)², Ali Najafi (Ph.D Student)¹, Mehdi Shamsara (Ph.D)^{*2}, Mohammad Hossein Modarressi (Ph.D)^{*1}

¹ – Dept. of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² – Dept. of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21 64053209 Modaresi@tums.ac.ir

Received: 29 Jun 2019; Accepted: 21 Jan 2020

* Corresponding author. +98 9125413035 shamsa@nigeb.ac.ir

Introduction: *SPATA19* gene is expressed in developmental stages of testis and some organs, but so far its function has only been examined in the testis. In this study, we provided an effective pathway for the generation of these mice using new CRISPR / Cas9 nickase method while generating Spata19 knockout mice for future studies in other organs.

Materials and Methods: CRISPR / Cas9 nickase plasmids were synthesized using pX335 vector and designed gRNAs. So, each plasmid was transformed into *E.coli* and clonal selection was performed. The plasmids extracted from the bacteria were mixed in equal proportions and injected into the male pronucleus. Correspondingly, the zygotes carrying the plasmid were transferred to Oviduct of Foster mice. After pregnancy extent, born mice were analyzed.

Results: We generated global knockout mice using CRISPR/Cas9 nickase technology. This deletion was examined at three levels of DNA, RNA and protein. Generated 2 nucleotides deletion was confirmed by sequencing at three levels of DNA, RNA and protein. By translating the mutated RNA sequence, it was determined that this deletion could cause premature stop codon. Phenotypic analysis confirmed infertility of male homozygous mice (*Spata19* -/-).

Conclusion: By generating Spata19 knockout mice, we present a protocol for generation of knockout mice. These mice could be applied as the infertile male mice and also for further characterization of *Spata19* gene.

Keywords: Knock Out, Spata19, CRISPR/Cas9 Nickase, Mouse, Sperm, pX335.