ریزدست‌کاری جنین پستانداران اصول، پیشرفتها و امکانات آینده

مترجم: دکتر خسرو حسینی‌پژوه - عضو هیأت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

چکیده

در طول دهه اخیر، پیشرفتهای زیادی در زمینه تکامل تکنیکهای دست‌کاری جنین پستانداران در خارج از محیط بدن مادر صورت گرفته است. بعضی از این تکنیکها در ابتداء برای استفاده در تحقیقات به‌وجود آمدند و بعضی دیگر از آنها عمدتاً" برای حل مسائل علمی مربوط به تولیدات دامی ابداع گردیدند. ولی در عین حال برای استفاده در تحقیقات هم به همان اندازه مفید بودند. روشهای ریزدست‌کاری [1] بر روی جنین، اغلب در ارتباط با انتقال جنین مطرح است و توجه دانشمندان به این روشها همراه با رشد صنعت انتقال جنین مطرح است و توجه دانشمندان به این روشها همراه با رشد صنعت انتقال جنین بوده است. در این مقاله درباره روشهای دست‌کاری سلولهای جنسی و جنین" از جمله تزریق اسپرم به داخل اُاسیت‌ها و جداکردن سلولهای بنیادی جنین [2] انتقال هسته و پیش هسته [3]، بیوپسی و تقسیم جنین، تولید تجربی کیمرا بحث شده است.

مقدمه

ریزدست‌کاری که بنام ریز جراحی [4] نیز نامیده می‌شود به طور وسیعی در بیولوژی سلولی، جنین‌شناسی الکتروفیزیولوژی، علوم بالینی و مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این روشها اغلب از میکروسکوپ و ریزابزارها برای عمل بر روی ساختمانهای سلولی و تحت سلولی استفاده می‌کنند. به همین مناسبت از تکنیکهای مختلف ریزدست‌کاری در حیوانات، گیاهان و انسان استفاده شده است. در این مقاله بیشتر درباره کاربردهای تکنیکهای ریز دست‌کاری بر روی جنین و سلولهای جنسی پستانداران بحث شده است. بیشتر این روشها نیازمند تکنیک نسبتاً" ساده جمع‌آوری و انتقال جنین هستند. اگرچه انتقال جنین برای اولین بار در بیش از یک قرن پیش انجام شد، اما تا قبل از سال ۱۹۵۰ توجه کمی به آن می‌شد. در نتیجه احتمالاً" بیش از ۹۵٪ تحقیقات انتشار یافته، مربوط به ۳۰ تا ۴۰ سال اخیر می‌باشد. جنبه‌های تکنولوژیکی بسیاری در مقالات متعدد مورد بحث قرارگرفته است و در این مقاله استفاده اقتصادی و تجارتی آنها به‌طور کلی مورد بحث قرار می‌گیرد.

بحث

باروری به طریق ریز جراحی

ایجاد لقاح با انتقال اسپرم از طریق ریزجراحی (ریز لقاحی = ریزباروری [5]) که به نام تلقیح میکروسکوپی نیز نامیده می‌شود، به روند وارد کردن اسپرماتوزوای کامل یا هسته اسپرم (سر اسپرمها) به داخل اُاپلاسم یا فضای پری‌ویتلین [6] یک اووم به کمک میکروسکوپ اطلاق می‌شود. این روش می‌تواند شامل روشهای تزریق مستقیم اسپرم به داخل اُاپلاسم، وارد کردن اسپرم به فضای پری‌ویتلین یا تزریق به زیر لایه زونا پلوسیدا، و یا ایجاد شکافهای متعدد در زونا برای تسهیل نفوذ اسپرماتوزوئیدها به داخل اووم باشد. در چند سال اخیر مقالات متعددی، جنبه‌های مختلف این تکنولوژی را برای مطالعات کلینیکی، پرورش حیوانات و تحقیقات مطرح کرده‌اند. شاید مهمترین پیشرفت در زمینه ریزباروری، تزریق یک یا چندین اسپرماتوزوئید متحرک ظرفیت یافته [7] و با آکروزوم فعال به زیر لایه زونا بوده است. از زمان اولین گزارش ایجاد آبستنی در موش با این روش تا بحال چندین تولد نوزاد در انسان به این طریق حاصل شده است. یک مشکل عمده در این روش محدودیت انتخاب اسپرم مناسب است. این مشکل ممکن است با سوراخ کردن زونا یا شکاف دادن قسمتی از زونا (PZD) [8] بر طرف شود. یافته مهم دیگر استفاده از محلول هیپرتونیک برای کمک به ریزدست‌کاری با دهیدراته کردن اُاسیت و نتیجتاً" افزایش فضای پری‌ویتلین برای تزریق اسپرم، انتقال هسته و دیگر انواع دست‌کاری برروی جنین است. این حالت به طور طبیعی با استفاده از محیط حاوی ۰/۵-۰/۱ مولار سوکروز به دست می‌آید. Yang و همکاران در یک سری مطالعه نشان دادند که اُاسیت‌ها، زیگوت‌ها و جنین‌های خرگوش می‌توانند سوکروزهیپرتونیک (۵٪) در PBS را تا یک ساعت تحمل کنند، بدون آنکه کاهش در میزان تکامل جنینی‌یاقدرت‌باروری‌آزمایشگاهی اُاسیت پیش آید.

علاوه براین هنگامی که ۱۹۲ جنین خرگوش به مدت ۰ (کنترل)، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در معرض ۰/۵ مولار سوکروز در PBS قرار گرفتند و سپس به گیرنده‌ها منتقل شدند به ترتیب ۳۹٪، ۴۲٪ و ۳۱٪ جنینها منجر به تولد نوزاد شدند. با ارائه این اطلاعات، Chohen و Malter توانستند میزان بالایی از لقاح و تکامل جنینی را با انجام برش قسمتی از زونا به کمک محلول سوکروز هیپرتونیک به‌دست آورند. این روش سپس با موفقیت در مورد انسان به کار رفت. در حال حاضر گمان می‌رود که بیش از یکصد نوزاد با روش باروری با کمک برش جزئی زونا به دنیا آمده باشند.

اغلب روشهای لقاح از جمله داخل کردن اسپرم به زیر لایه زونا، سوراخ کردن زونا یا برش جزئی زونا به استفاده از اسپرماتوزوئید متحرک نیاز دارد. روش قراردادی تزریق مستقیم اسپرم به اُاپلاسم قبل از تزریق احتیاج به اعمال متعددی دارد تا فعال شدن آکروزم ایجاد شود. اخیراً" Goto و همکارن روشی را برای تزریق مستقیم اسپرم کشته شده به داخل اُاپلاسم اُاسیت به دنبال مجاورت با کلسیم یونوفور و انجماد دوبل و ذوب کردن آنها و بدون استفاده از Cryoprotectants ارائه کرده‌اند. این روش منجر به تولید گوساله‌های زنده شده است. وقتی این روش با تزریق همان نوع اسپرم به زیر زونا مقایسه شد، در روش اول (تزریق مستقیم به داخل اُاپلاسم) به طور مشخصی اُاسیت‌های بیشتری بارور شدند. حتی اعجاب‌انگیزتر آنکه تزریق مستقیم یک اسپرم دارای دم غیر متحرک (Stump tail sperm)، از یک گاونر غیر بارور منجر به باروری بالا و قابل مقایسه با باروری حاصل از گاو نر بسیار بارور می‌شود (به ترتیب ۳۴٪ در مقابل ۳۹٪). گزارشی از انجام و آزمایش این روش در انسان منتشر نشده است.

ریزدست‌کاری زونا پلوسیدا

اُاسیت‌ها و جنینهای اغلب پستانداران به وسیله

لایه زوناپلوسیدا احاطه شده است. زوناپلوسیدا لایه‌ای غیر سلولی و دارای ساختمان گلیکوپروتئینی است. زوناپلوسیدا اعمال زیادی به عهده دارد که از جمله آنها (در بعضی گونه‌ها) ایجاد واکنش آکروزوم[9] بعد از اتصال اسپرم با گیرنده‌های زونا، جلوگیری از لقاح چند اسپرمی و همچنین محافظت از جنین است. اکثر روشهای ریزدست‌کاری بر اساس سفتی و سختی زونا انجام می‌شود. کشت آزمایشگاهی اُاسیت و جنین اغلب باعث سخت شدن زوناپلوسیدا می‌شود و تکنیکهای ریزدست‌کاری برای تغییر آن ممکن است مهم باشد. برای مثال بازکردن مکانیکی زوناپلوسیدای جنین کشت داده شده انسان و موش به طور مشخصی میزان لانه گزینی را افزایش می‌دهد.

برداشت و تعویض پیش هسته

پیش هسته، بر حسب گونه حیوان، به‌طور طبیعی در عرض چند ساعت پس از لقاح تشکیل می‌شود. در جنین موش می‌توان پیش هسته‌ها را قابل مشاهده ساخت (به‌طور طبیعی یک پیش هسته مربوط به گامت نر و یکی مربوط به گامت ماده است). و حتی می‌توان در زیر یک میکروسکوپ پیش هسته‌های نر و ماده را تمیز داد. بیش از ۹۰٪ مقالات مربوط به دست‌کاری پیش هسته در مورد این گونهٔ حیوانی است. مطالعات کلاسیک با امید به تولید دسته‌هایی از حیوانات یک‌والدی هموزیگوت به‌پیش می‌رود.

یک مثال برای روش آزمایشی این مورد، برداشتن پیش هسته نر یا ماده از یک جنین یک سلولی و سپس دیپلوئید کردن آن با سیتوکالسین B[10] می‌باشد. از نظر تئوری حیوانات بدست آمده از چنین تخم‌های دست‌کاری شده‌ای به طور کامل هموزیگوت هستند و تمام ژنومشان فقط از یک والد (پدر یا مادر) است. تا کنون ایجاد تعداد کمی از چنین حیوانات تک والدی که دارای ژنوم پدری یا مادری هستند گزارش شده است. البته نتایج مشابهی توسط دیگر محققین به دست نیامده است و این یافته‌ها تا کنون به‌طور مستدل تائید نشده‌اند.

انتقال هسته به داخل زیگوتی که هسته‌اش برداشته شده است، در بعضی آزمایشگاهها به ایجاد تخم‌های حاوی دو پیش هسته‌نر (دو پدری، نرزائی) یا دو پیش‌هسته ماده (دو مادری، ماده‌زائی) و یا پیش هسته‌هایی یکی نر و دیگری ماده باشد منجر شده است. فقط تخم‌های حاوی هر دو پیش هسته‌نر و ماده تا زایمان تکامل یافته‌اند. با ابداع یک روش غیر تخریبی توسط McGrath و Solter، درحدود ۵۰-۴۰٪ تخمهای تجدید ساختار شده هتروزیگوت با یک پیش هسته‌نر و یک پیش هسته ماده توانسته‌اند رشد نموده و آبستنی منجر به زیمان شود. در مقابل، تخمهای هتروزیگوت یک جنسی (هر دو پیش هسته نر و یاماده) در موش، در بهترین شرایط و حالات فقط تا نیمه آبستنی توانسته‌اند پیش بروند. این موضوع نشان میدهد که ژنومها در طی گامتوژنز، "Imprint"[11] می‌شوند، به طوی که پیش هسته نر و ماده به طور عملی با هم متفاوت هستند و هر دو ژنوم برای تکامل طبیعی جنینی مورد نیاز هستند.

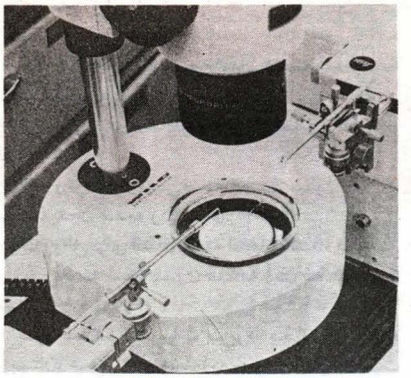
کاربرد دیگر دست‌کاری پیش هسته برداشت پیش هسته (نر) اضافی در موارد لقاح پلی‌اسپرمی است.

به طور طبیعی وقتی که یک اُاسیت نابالغ است مثل مرحله متافاز یک و یا پیر است، گرانولهای cortical ممکن است به طور مناسبی در قسمت Sub cortical پراکنده نشوند و در نتیجه سد دفاعی مقابله با پلی اسپرمی تضعیف شود. همچنین ممکن است به دنبال دستکاری مختلف روی اُاسیت، مثل تزریق اسپرم، برش قسمتی از زونا (PZD)، سوراخ کردن زونا و یا سایر روشهای شکاف‌دهنده زونا پلی‌اسپرمی رخ دهد.

در تئوری اگر پیش هسته‌های نر اضافی برداشته شوند جنین ممکن است حالت طبیعی خود را حفظ کند. این موضوع در چندین آزمایشگاه مربوط به "IVF" انسانی انجام شده است.

پیوند غشائی گامتها و سلولهای جنینی

پیوند و امتزاج غشائی در سلولهای حیوانی و گیاهی نقش مهمی را در بسیاری از فرآیندهای



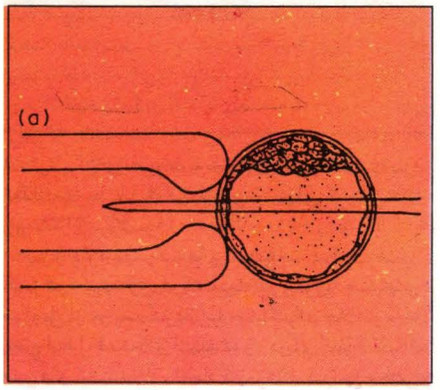
بیولوژیک ایفا می‌کند. امتزاج و پیوند سلول به سلول در آزمایشگاه اهمیت زیادی در تحقیقات غشاءها، اثر متقابل هسته - سیتوپلاسم، هیبرید کردن سلول‌های سوماتیک و مهندسی ژنتیک دارا است.

سابقاً" امتزاج سلولی با استفاده از مواد شیمیائی نظیر پلی اتیلن گلیکول و یا ویروسهای غیر فعال بدست می‌آمد اخیراً" Zimmermann و همکارانش یک روش پیوند سلولی با استفاده از الکتریسیته را ارائه داده‌اند که بطور وسیعی برای ایجاد ترکیب و امتزاج سلولهای حیوانی و گیاهی در تحقیق و عمل به کار رفته است. بعضی از مطالعات اولیه برای پیوند هسته در موش شامل استفاده از ویروس Sendai بوده است. بعدها، Willadsen اثر تحریک الکتریکی و ویروس Sendai را در مطالعات انتقال هسته‌ای درگوسفندباهم مقایسه کرد و دریافت که پیوندحاصل ازضربانهای الکتریکی بسیاربهتربوده‌است.

امروزه الکتروفیوژن بخشی مهم و حیاتی از شما و طرح انتقال هسته است. به خاطر تفاوت اندازه اُاسیت با بلاستومرها ایجاد پیوند غشا با ضربات الکتریکی، توسط اعمال مکانیکی نیز حمایت می‌شد. Smith و Wilmut اثر مفیدی را با ضربانهای AC (جریان غیر مستقیم الکتریسیته) هنگامی که از سلولهای ICM کوچک استفاده می‌شد گزارش کردند. مطالعات انجام شده در دانشگاه Cornell این یافته‌ها را تائید کرد و مشخص شد که سلسله ضربانهای جریان غیر مستقیم با روشهای مکانیکی پیوند قابل مقایسه هستند.

کلونینگ به وسیله جداکردن بلاستومر یا شکافتن وگردهم آوردن جنین

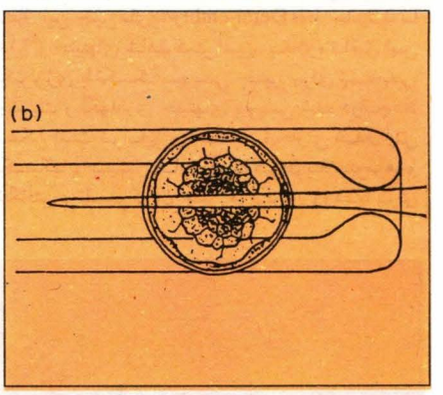
امکان تقسیم جنین پستانداران در مراحل اولیه رشد (با ریز جراحی) به دو یا چند قسمت و توانایی تکامل و تبدیل هر قسمت به یک جنین مجزا، از چندین دهه قبل مطرح شده است. اولین مجموعه از موشهای یکسان با جدا کردن مکانیکی بلاستومرهای جنینهای دو سلولی در سال ۱۹۷۰ و از دو نیم کردن مورولا در سال ۱۹۷۸ تولید شد. Willadsen و همکاران با استفاده از روش مشابه اما با ایجاد تکنیک فروکردن داخل آگار، تولید موفق دوقلوها و چند قلوهای مشابه را در چندین گونه از جمله گوسفند، گاو، اسب و خوک گزارش کردند. کشف تکنیکهای شکافتن و تقسیم کردن مورولا و بلاستوسیت گاوی به میزان زیادی به کاربرد اقتصادی این تکنولوژی کمک کرده است. جنینهای موجود در این مراحل را می‌توان جمع‌آوری نموده و با روش غیر جراحی به گاو منتقل کرد. در چند سال گذشته تقسیم جنین تازهٔ گاو بطور تجارتی انجام پذیرفته است و میزان آبستنی به دنبال انتقال این جنین‌های Demi-embryo فقط حدود ۵ تا ۱۰٪ از جنینهای شاهد کمتر است. بعلاوه تلفیق این تکنولوژی با تکنیک بیوپسی جنین برای تشخیص جنسیت و نگهداری جنینهای بیوپسی شده درانجماد ممکن است توانایی و استعداد تجارتی شدن این تکنیکها را بیشتر سازد. جداکردن بلاستومرها و شکافتن و تقسیم کردن جنین مؤثرترین روشها برای



کلونینگ حیوانات هستند البته محدودیت‌ها یا موانع کلونینگ حیوانات نیز متعدد هستند. موارد زیر به عنوان نمونه آمده است.

۱- حداکثر تولید به ازای هر جنین در بهترین شرایط محدود به ۳ تا ۴ نوزاد است و تقسیم جنین به بیش از ۴ قسمت منجر به از دست رفتن کامل توانائی تکامل آنها می‌شود.

۲- جدا کردن بلاستومر یا دونیم کردن جنین، برنامه تکاملی اصلی جنین را تغییر نمی‌دهد. بنابراین تقسیمات مکرر جنین منجر به ایجاد جنینهای متعدد نمی‌شود. جنینهای قبل از لانه گزینی بدون توجه به گونه مربوطه اینطور برنامه‌ریزی شده‌اند که بعد از تعداد معینی تقسیم (که بر حسب گونه متفاوت است) شکل بلاستوسیست را به خود بگیرند. زمان تقسیمات بعدی و تشکیل بلاستوسیست تحت تاثیر کاهش تعداد سلولها متعاقب تقسیم جنین یا جدا کردن بلاستومرها، قرار نمی‌گیرد. برای مثال جنینهای گوسفند و گاو بعد از شش بار تقسیم یعنی در حالت ۶۴ سلولی تبدیل به بلاستوسیست می‌شوند. این تعداد در خرگوش ۷ بار تقسیم و ۱۲۸ سلول و در موش ۵ بار تقسیم و ۳۲ سلول است. همچنانکه در بسیاری گونه‌ها نشان داده شده است و دو نیم کردن جنین و یا جدا کردن بلاستومرها و کشت آنها به تشکیل ساختمانهای بلاستوسیستی کوچکتر و با تعداد سلول کمتر منجر شده است، زیرا تشکیل بلاستوسیست در زمان برنامه‌ریزی شده اصلی انجام می‌شده است. وقتی که بلاستومرهای جنین خرگوش بعد از سومین، چهارمین و یا پنجمین بار تقسیم (Clevage)، به ترتیب در مرحله ۸، ۱۶ و ۳۲ سلول جدا شده و به طور مجزا کشت داده شدند، وزیکولهای بلاستوسیست کوچکتری، بدون Inner cell mass، تشکیل شدند. تعداد متوسط سلولها در وزیکول‌ها به ترتیب ۲۹، ۱۶ و ۷ عدد بودند که در حدود ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ تعداد سلولهای



بلاستوسیستهای مربوط به جنینهای گروه کنترل بود (تعداد متوسط سلول در بلاستوسیستهای گروه کنترل برابر با ۲۴۴ سلول بود).

۳- با وجود پیشرفت‌ها و تحقیقات فراوان، هنوز تکنیک نگهداری در انجماد در مورد جنینهای حاصل از دو نیم کردن یا جدا کردن بلاستومرها روش قابل اعتمادی نیست. راه دیگر کلون کردن جنین‌های پستانداران، ایجاد کایمرهای فتوسی-جفتی (Fetal-Placental Chimeras) با ترکیب بلاستومرهای جنینی "target" با بلاستومرهای "helper" است. چنین فرض می‌شود که محدودیت تکامل بلاستوسیستهای کوچک مشتق از مثلا" یک بلاستومر برداشته شده از یک جنین ۸ سلولی به دلیل وجود تعداد ناکافی سلول در بلاستوسیست است. در گوسفند وقتی بلاستومر جدا شده از یک جنین ۸ سلولی با یک بلاستومر جدا شده از جنین ۴ سلولی ترکیب شد به نظر می‌رسید که، بره متولد شده بیشتر از بلاستومر جنین ۸ سلولی مشتق شده باشد، گرچه تولد بره‌های کایمری مشتق از هر دو جنین هم غیر معمول نیست. بیشترین تعداد حیوانات مشابه از نظر ژنتیکی (کلون)که با این روش ایجاد شد، ۵ راس بود. این نتایج بعدا" به وسیله آزمایشهای Tsunoda و همکاران با ترکیب بلاستومر ۸ سلولی با جنین ۴ سلولی حاصل از بکرزائی در موش تائید شد. با این وجود کایمریسم در هر دو بافت جنینی و جفتی قابل تشخیص بود. گزارشهای دیگر از چندین گونه مختلف نشان داد که بلاستومرهای کمتر تکامل یافته در جمع شدن با بلاستومرهای تکامل یافته‌تر ممکن است بخوبی در ایجاد بلاستوسیست شرکت کنند و در تکامل فتوس سهیم شوند. بنابراین مانع مهم در استفاده از روشهای کایمری برای تولید حیوانات یکسان، احتمال ایجاد حیوانات کایمری ناخواسته است. بعلاوه این روش اغلب کسل کننده و غیر موثر می‌باشد.

کلونینگ به وسیله انتقال هسته و مشکل گوساله‌های غول پیکر

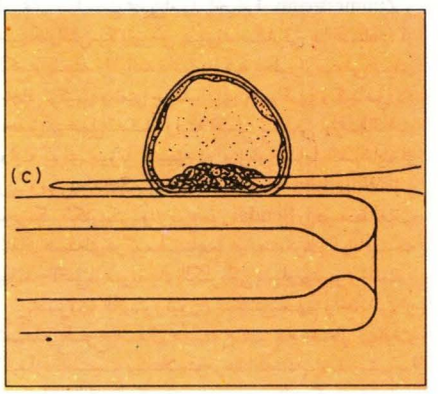
کلونینک جنین به وسیله انتقال هسته شامل سه تکنیک اساسی می‌شود.

۱- یک روش برای جدا کردن هسته سالم و کامل از سلول دهنده.

۲- یک روش برای بی‌هسته کردن سلول میزبان (اُاسیت) بدون صدمه زدن به آن.

۳- یک روش برای انتقال هسته انتخاب شده بداخل اوول بی‌هسته شده بدون صدمه زدن به هسته یا اُاسیت.

بر خلاف تجربیات مربوط به انتقال هسته دوزیستان، عمل انتقال هسته، به خودی خود اُاسیت پستانداران را فعال نمی‌کند. تزریق مستقیم هسته دهنده به اُاپلاسم باعث لیزه شده غشاء در اکثریت اُاسیت‌های گیرنده می‌شود. بنابراین علاوه بر سه تکنیک اولیه، روشهای فعال کردن اُاسیت و اتصال و امتزاج غیر تهاجمی غشاءها برای ورود هسته دهنده به اُاپلاسم گیرنده، چهارمین جزء مهم تکنولوژی



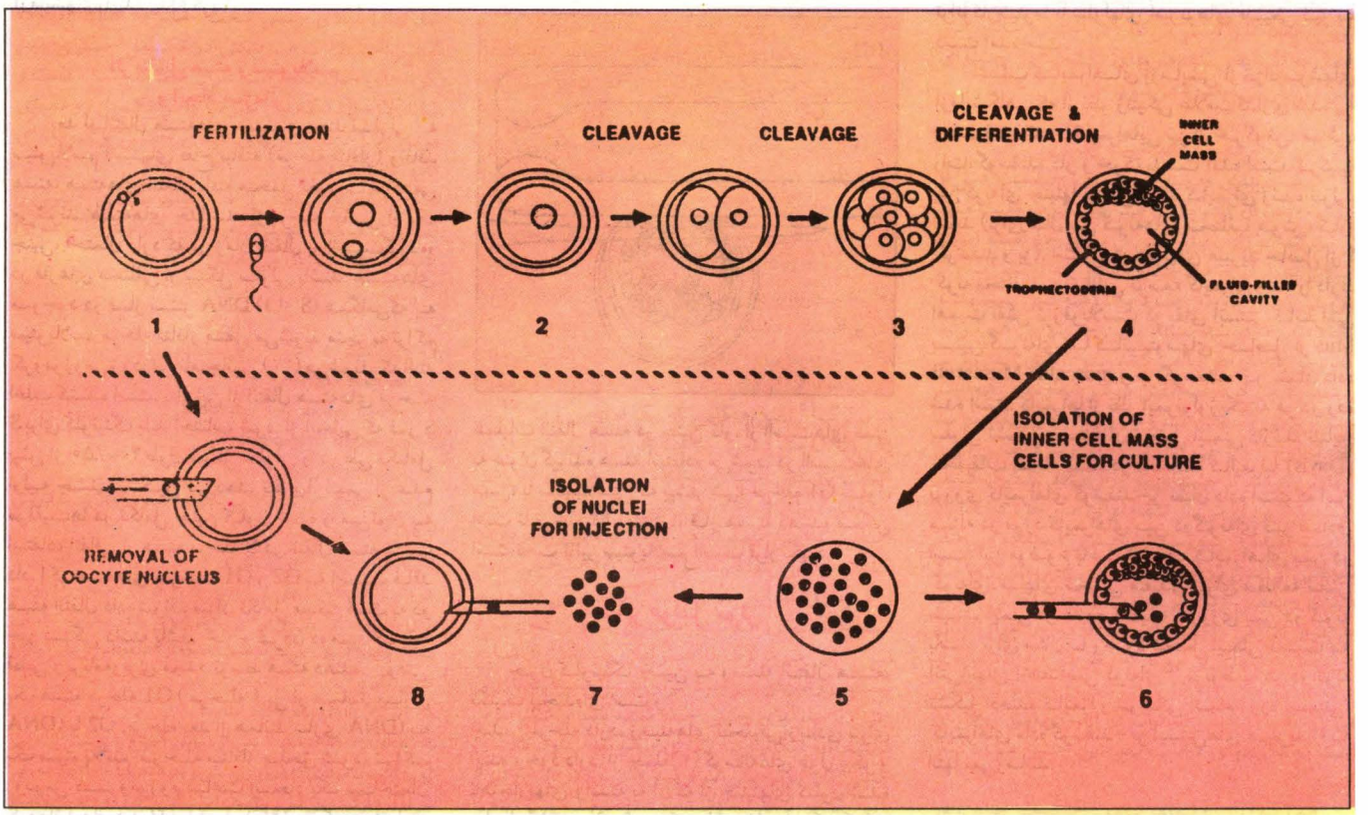
انتقال هسته در پستانداران را تشکیل می‌دهد.

ضربانهای الکتریکی مناسب مورد استفاده در روشهای جاری انتقال هسته می‌تواند باعث فعال شدن اُاسیت و نیز اتصال و امتزاج غشاء بین سلول دهنده هسته و اُاسیت گیرنده بدون هسته شود. روشهای انتقال هسته منجر به تولید موفق حیواناتی از جمله خرگوش، موش، گوسفند، بز، گاو و خوک شده است. تا به حال نشان داده‌اند که فقط هسته‌های جنینهای مرحله پیش‌لانه گزینی برای این منظور مناسب هستند. موفقیت کلی هنوز چشمگیر نیست. درگاو میزان موفقیت در هر مرحله به صورت ذیل است: برداشت هسته ۷۰٪-۸۰٪ اتصال دو غشاء ۸۰٪-۷۰٪، فعال کردن ۸۰٪-۷۰٪، تکامل به مرحله مورولا - بلاستوسیست جنینهای کلون شده ۲۰٪-۳۰٪، و بقاء جنین تا زایمان ۲۰٪-۳۰٪، میزان موفقیت کلی حدود ۶۰٪-۱٪ است. اخیرا" استفاده از تکنیک انتقال پی‌درپی جنینهای دهنده هسته نیز به برنامه کلونینگ هسته در گاو افزوده شده است. امید می‌رود که با استفاده از جنینهای کلون شده به عنوان دهنده مکرر هسته، بتوان کلونهای بیشتری به دست آورد. خوشبختانه این روش انتقال پی‌درپی در مورد جنین گاو انجام گرفته است و با تولید نسل ششم جنین و نسل سوم گوساله امیدواری زیادی را باعث شده است. در یک مطالعه، ۱۹۰ جنین پیوند هسته یافته از طریق انتقال پی‌درپی هسته از یک جنین دهنده منفرد بدست آمده اما پیوند پی‌درپی از نسل چهارم به بعد منجر به افزایشی (به میزان معنی‌دار) در از بین رفتن جنینها در رحم شد و درنتیجه گوساله‌ای از طریق انتقال پی‌درپی هسته، بعد از نسل سوم کلونها به دست نیامد.

مشکل دیگر روشهای انتقال هسته در حال حاضر آن است که غالبا" گوساله‌های عظیم‌الجثه تولید شده که و منجر به سخت‌زایی می‌شود.متوسط وزن گوساله‌های کلون شده حدود ۱۵٪-۱۰٪ بیشتر از گوساله‌های کنترل است و بیش از ۲۰٪ از مادر خوانده‌های آنها دچار مشکلات زایمانی می‌شوند. ۲۵٪ گوساله‌های کلون شده، در هنگام زایمان یا بلافاصله بعد از آن به خاطر سخت‌زایی و دیگر ناهنجاریهای مربوطه می‌میرند. استفاده از سلولهای بنیادی جنینی به عنوان سلولهای دهنده هسته، یک ایده جالب برای بسیاری از محققین بوده است. این سلولها توانائی تبدیل به تمام انواع سلولی را نشان می‌دهند و با استفاده از انتقال هسته عملا" ممکن است تعداد نامحدودی از حیوانات با ساختار ژنتیکی مشابه به دست آید. متاسفانه در حال حاضر بجز موش در سایر حیوانات، رده‌های سلولی بنیادی جنینی (قابل تبدیل به تمام انواع سلولی) مشخصی گزارش نشده است.

با وجود مشکلات موجود، انتقال هسته به عنوان یکی از روشهای اساسی تولید نوزادان یکسان، مزایای زیادی بر جدا کردن بلاستومرها یا دو نیم کردن جنین و یا تولید حیوانات کایمرا دارد. این مزیتها عبارتند از: ۱- سلولهای جنینی منفرد تا مرحله ۶۴ سلولی می‌توانند مجددا" برای مرحله زیگوت یک سلولی برنامه‌ریزی شوند و تولید کپی‌های متعدد از حیوانات با خصوصیات ژنتیکی عالی و مشابه یکدیگر (به جز توارث سیتوپلاسم)

امکانپذیر است. (۲) در حال حاضر کلونینگ مکرر به وسیله انتقال هیته جنینهای کلون شده عملی



شکل ۱: دستکاری آزمایشگاهی سلولهای بنیادی جنینی، بعد از باروری اُاسیت (۱) با اسپرم، زیگوت (۲) دستخوش تقسیمات اولیه می‌شود (۳) و مورلا تشکیل می‌گردد که این مورولا نهایتاً به بلاستوسیست تبدیل می‌شود (۴) توده سلولی داخلی بلاستوسیست می‌تواند برداشته شده و در محیط کشت قرار داده شود تا رده‌های سلولهای بنیادی جنینی تشکیل شود (۵). سلولهای بنیادی جنینی می‌توانند از نظر ژنتیکی دستکاری شوند و سپس به یک بلاستوسیست گیرنده برگردانده شوند (۶) تا حیوانات ترانسژنیک تولید شوند. همچنین این سلولهای بنیادی می‌توانند به عنوان دهنده هسته (۷) برای تزریق داخل یک اُاسیت بدون هسته به کار روند (۸) تا تولید نوزادان همانند کنند.

است که این موضوع پتانسیل این تکنولوژی را، حتی برای تولید کلونهای بزرگتر افزایش می‌دهد.

۳- تعیین جنسیت جنین می‌تواند در طرح کلونینگ به کارگرفته شود به طوری که هر کلون از همان جنس از پیش تعیین شده باشد.

۴-جنینهای حاصل از سویه‌های ژنتیکی مختلف را می‌توان منجمد و پس از آزمایش کلونها از جهت صفاتی که واجد اهمیت اقتصادی هستند آنها را تکثیر نمود.

تحقیقات آینده در رابطه با انتقال هسته می‌تواند بسیار هیجان‌انگیز و جالب باشد. همچنانکه در بالا بحث شد، انتقال هسته شامل چندین مرحله است. در تئوری، موفقیت انتقال هسته ممکن است به وسیله روشهای ظریف‌ریز جراحی و نیز عوامل پیچیده بیولوژیک تحت تأثیر قرار گیرد. تجزیه و تحلیل مقالات مربوطه حاکی از این است که اکثر مقالات منتشره در طول چند سال اخیر به سمت تکمیل مراحل مختلف تکنولوژی ریز جراحی در طرح جاری کلونینگ، گرایش یافته است. البته تحقیقات مربوط به تاثیر فاکتورهای بیولوژیک کاملاً جدید است. بعضی از این فاکتورها ذیلاً به طور روشنتر بحث شده است.

کنترل سیکل سلول و انتخاب آن

اهمیت این جنبه از تحقیقات انتقال هسته در مطالعات اخیر بر روی خرگوش و موش به خوبی روشن شده است. هسته‌های مرحله (G_1، G_2) برای انتقال هسته بترتیب در ایجاد فیوژن یا تحریک الکتریکی یا با ویروس Sendai و ایجاد تحریک با اتانول به کار می‌روند. تحقیقات بیشتری برای امتحان قابلیت حیات این جنین‌ها در بدن مادر و یافتن کاربردهای این یافته‌ها درگاو لازم است. بعلاوه دربارهٔ سمیت و تأثیر مواد شیمیائی مورد استفاده برای کنترل سیکل سلول، تحقیقات بیشتری باید صورت پذیرد.

به عنوان مثال نتایج اولیه در موش و خرگوش نشان می‌دهد که Nocodazole به خاطر سمیت پاینش برای جنین ممکن است در مقایسه با Calcemide ماده مناسب‌تری برای کنترل سیکل سلول باشد.

فعال کردن اُاسیت و پلوئیدی

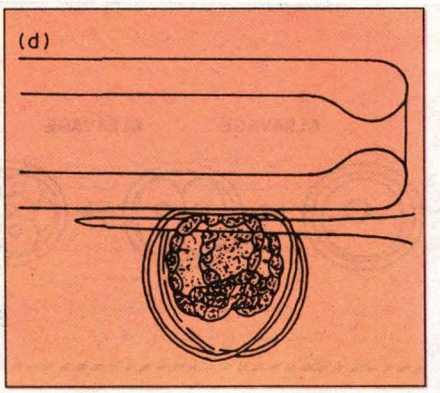
فعال کردن اُاسیت، زمینه مهمی برای تحقیقات انتقال هسته ایجاد می‌کند. اخیراً yang و همکاران دریافته‌اند که اُاسیتهای خرگوش به علت تشکیل تاخیری پیش هسته به دنبال فعال شدن، بندرت تقسیم و شکاف یافته و به مرحله بلاستوسیست تکامل نمی‌یابند. همچنین Adenot و همکاران گزارش کردند که شروع تورم هسته بر تکامل اُاسیت فعال شدهٔ خرگوش تأثیر می‌گذارد. نتایج این آزمایشها نشان می‌دهد که درجات مختلفی از فعال شدن وجود دارد و فقط اُاسیتهایی که به‌طور کافی فعال شده باشند تکامل می‌یابند. مشخص شده است که استفاده از ترکیبات مختلفی از ضربانهای شیمیایی و الکتریکی برای فعال کردن اُاسیتهای جوان و بالغ، درصد بالایی از تکامل پیش هسته را باعث می‌شود، اما مسائل مربوط به‌استعداد و توانایی تکاملی بعدی این اُاسیتها در بدن یا آزمایشگاه، احتمال اثر سمی این مجموعه ترکیبی و امکان استفاده از این روشها برای انتقال هسته احتیاج به مطالعات بیشتری دارد.

موضوع دیگری که باید مورد مطالعه قرار گیرد پاسخ یون کلسیم داخل سلول اُاسیت و سنتز پروتئین یا تغییر آن به دنبال این عمل و انتقال هسته است. عقیده بر این است که بیشتر تحریکات فعال کنندهٔ مؤثر تحریکاتی هستند که پاسخ اُاسیت به ورود اسپرم بارورکننده را تقلید بکنند. با ساخت ترکیبات مختلف تقلید کنندهٔ لقاح شاید بتوان روشهای مناسبی برای

آزمایشهای آینده ابداع کرد.

اثر متقابل هسته و سیتوپلاسم و ایجاد همزمانی

بعد از انتقال هسته‌های جنینهای چند سلولی به سیتوپلاسم اُاسیتهای لقاح نیافته (مرحله متافاز) و فاقد هسته، هسته‌های انتقال یافته متحمل تغییرات مختلفی می‌شوند. هسته‌های جدا شده از مرحله خاصی از یک جنین، احتمال دارد که در زمان انتقال به اُاسیت‌گیرنده در فازهای مختلفی از سیکل سلولی باشند. هسته‌های موجود در فاز سنتز DNA (فاز S) هنگامی‌که به سیتوپلاسم مرحله متافاز منتقل می‌شوند منجر به تراکم کروموزومی زودرس نامتجانس (۱۲) می‌شوند، که البته اغلب کشنده است. بنابراین از انتقال هسته‌های مرحله S برای کلونینگ باید اجتناب شود. از آنجایی که فاز S بیش از ۵۰٪-۴۰ طول سیکل سلولی را در طی تکامل اولیه جنینی تشکیل می‌دهد، تقریباً نیمی از عدم موفقیت‌ها در تکامل جنین کلون شده را می‌توان به استفاده اتفاقی از هسته مرحله S در انتقال هسته نسبت داد. اگر هسته‌های مرحله G1 و G2 به اُاسیت فاقد هسته انتقال داده شوند، میزان تکامل ممکن است به دو چیز بستگی داشته باشد. خارج کردن دومین گویچهٔ قطبی و برنامه‌ریزی مجدد توسط هسته دهنده. وقتی یک هسته مرحله G1 (مرحله قبل از همانند سازی DNA) یا G2 (مرحله بعد از همانند سازی DNA) به یک سیتوپلاسم مرحله متافاز ملحق شود، تراکم زودرس کروموزوم باعث ایجاد یک ساختمان کروماتید منفرد (2C) یا دوبل (4C) می‌گردد. در این زمان اگر تقسیم سلولی ایجاد شود (آزادی جسم قطبی دوم) احتمالاً یک هسته G2 برای تکامل طبیعی دیپلوئید لازم است زیرا تقسیم اول میتوز (تقسیم میتوتیک) بعد از سنتز (یا همانند سازی) DNA باقیمانده و ($\frac{1}{2}$ در جسم قطبی دوم، $\frac{1}{2}$ در اُاسیت) به طور طبیعی تا مرحله پیش هسته پیش میرود. اگر آزاد سازی دومین گویچهٔ قطبی انجام نشود هسته دهنده متحمل تراکم زودرس کروموزوم، (عدم انجام تقسیم دوم میوز)، انبساط کروموزومی (chromosal decondensaton) و تشکیل پیش هسته که در طی آن سنتز DNA اتفاق می‌افتد خواهد شد. در موارد تاخیری، هسته مرحله G1 برای تکامل دیپلوئید طبیعی مورد نیاز است. مطالعات انجام شده در دانشگاه Cornell نشان داده است که فعالیت اُاسیت (ایجاد شده به وسیله پاسهای الکتریکی)، منجر به توقف آزاد شدن دومین گویچهٔ قطبی شده در حالی که فعالیت ایجاد شده به وسیله اتانول منجر به تکامل هاپلوئید بیشتر می‌شود. اگر این یافته‌ها قابل تکرار باشد، باید هنگامی که از الکتریسیته برای فعال کردن اُاسیت استفاده می‌شود، از یک هسته مرحله G1 برای انتقال هسته استفاده کرد. در صورتی که هسته‌مرحله G2 باید هنگامی که فعال کردن به وسیله اتانول انجام شده است استفاده شود. این یافته‌ها، گزارشهای بحث انگیز اخیر در مورد مرحله مناسب سیکل هسته برای کلونینگ را توضیح می‌دهد. در مقابل، وقتی‌که عامل دوم یعنی برنامه‌ریزی مجدد مطرح است، مرحله سیکل هسته دهنده ممکن است اهمیت کمتری داشته باشد. در



عملیات انتقال هسته در جنین گاو، از اُاسیت‌های مسن به عنوان گیرنده هسته استفاده می‌شود. در اُاسیت‌های مسن، با سیتوپلاستی که بیشتر شبیه مرحله G1 سلول است تا مرحله M (متافاز)، فاز هسته دهنده ممکن است تحت تاثیر سیتوپلاسم اُاسیت قرار نگیرد.

سایر عوامل موثر

چون کلونینگ جنین به وسیله انتقال هسته، تکنیک پیچیده‌ای است و چندین مرحله دارد، زمینه‌های تحقیقی زیادی برای آینده وجود دارد. از جمله: ۱) گوساله‌های غول پیکر و ناهنجاریهای وابسته به آن که از جنینهای کلون شده حاصل گشته و لازم است که با استفاده از تکنیکهای مولکولی مورد مطالعه قرار گیرند. ۲) امکان استفاده از سلولهای بنیادی جنینی برای انتقال هسته وجود دارد و احتیاج به تحقیقات طولانی می‌باشد. ۳) کشت و انجماد جنین و تکنولوژی سیکلیک شدن مجدد جنینهای کلون شده بدون پیشرفت باقی مانده است. ۴) بعضی از روشها احتیاج به ساده شدن و بهبود دارند.

کایمراها

در تحقیقات بیولوژیک کایمرا[13] یک حیوان ترکیبی است که سلولهایش از ۲ یا چند جنین مختلف مشتق شده است. کایمراهای پستانداران معمولاً به طور تجربی به وسیله تجمع ۲ یا چند جنین در مرحله تقسیم سلولی (کایمراهای ترکیبی) یا به وسیله تزریق سلولهای جنینی به داخل بلاستوسل یک بلاستوسیست (کایمراهای تزریقی) ایجاد می‌شوند. بعد از انتقال به رحم گیرنده مناسب این جنین کایمرایی می‌تواند فرآیندهای تکاملی‌اش تنظیم کند و به یک نوزاد زنده دارای ۲ یا چند جمعیت سلولی تبدیل شود. سلولهای علامت‌گذاری شدهٔ یک کایمرا برای مطالعات مربوط به تکامل جنین از جمله مطالعات مربوط به فهم کنترل تکامل طبیعی جنین، مفید است. برای مثال جنینهایی که با پارتنوژنز فعال شده‌اند به تنهائی قادر به ادامه رشد تکاملی خود نیستند، اما می‌توانند در تشکیل بافتهای یک کایمرا شرکت کنند مانند سلولهای جنسی اولیه[14]. مواردی از ترکیب سلولهای کارسینومای جنینی بدخیم، سلولهای بنیادی تمایز نیافته مشتق از تراتوکارسینوما با سلولهای آمبریوهای طبیعی نیز به دست آمده است.

اغلب کایمراهای آزمایشی از نژاد موشهای آزمایشگاهی که از نظر ژنتیکی علامت‌گذاری شده به دست آمده اند اما کایمراهایی نیز از خرگوش، موش، رات، گوسفند، گاو و خوک بدست آمده است. ترکیب بین گونه‌ای جنینها نیز می‌تواند کایمرای زنده تولید نماید (برای مثال بین گونه‌های مختلف موش، گاو، گوسفند و بز). استفاده از سلولهای هیبرید حاصل از ۲ گونه مختلف نیز توانایی توسعه کایمرای زنده را دارد. اهمیت نقش تروفوبلاست در بقای آبستنی کایمرایی بین گونه‌ای با کانسیتوسهای حاصل از Mus musculus-Muscaroli و نیز گوسفند- بز نشان داده شده است. کایمراها از نظر ایمونولوژیک به هر دو رده سلولی تشکیل دهنده آن تحمل ایمنی دارند. نتایج تحقیقات انجام شده در دانشگاه کالیفرنیا (Davis) برروی کایمراهای گوسفند-بز نشان داده است که این مسئله در مورد کایمراهای بین دوگونه‌ای نیز صادق است. این موضوع باعث شده که کایمراهای بین دو گونه‌ای، مدلهای تجربی مفیدی برای مطالعه نقش سیستم ایمنی در عدم موفقیت باروری بین دو گونه باشند. برای مثال با وجود تحمل ایمنی نسبت به آنتی‌ژنهای اختصاصی گونه‌ای[15] مربوط به هر دو گونه تشکیل دهنده کایمرا و توانائی اتمام دوره آبستنی، کایمراهای ماده گوسفند- بز آبستنی‌های هیبرید را به انتها نمی‌رسانند.

بیوپسی جنین

بیوپسی جنین با برداشت تعدادی از سلولهای جنینهای پیش لانه گزینی خرگوش به منظور تعیین جنسیت جنینها تقریباً از ۳۰ سال پیش انجام شده است. در حال حاضر روشهای مختلف بیوپسی جنین برای برداشتن جسم قطبی از یک اُاسیست، یک یا چند بلاستومر از یک جنین مرحله قبل از لانه گزینی و سلولهای تروفوکتودرم از یک جنین تکامل یافته‌تر و متصل به رحم ابداع شده است. اخیراً بیوپسی جنین به منظور تعیین جنسیت، مشخص نمودن و انتخاب صفات تولیدی در انتقال جنین گاو و در کلینیکهای باروری انسان برای تشخیص ناهنجاری‌های ژنتیکی بطور فزاینده‌ای رایج شده است. توسعه موارد و استعمال تکنیکهای بیوپسی ناشی از تکامل سریع در دو زمینه است. یکی تکامل و کاربرد تکنیکهای مولکولی در جنین‌شناسی مثل پروب کردن DNA[16] و دیگری واکنش زنجیره پلی‌مراز[17] است. این روشها امکان تعیین جنسیت دقیقتر و بسیار سریعتری را نسبت به روشهای قبلی کاریوتایپ یا آنزیمی فراهم می‌سازند. زمینه دیگر، ابداع و تکامل لقاح آزمایشگاهی اُاسیت وکشت و نگهداری در انجماد جنینهای بیوپسی شده است. این روشها منابع راحت و ارزانی از مواد مورد نیاز برای آزمایش و کاربرد تکنولوژی واکنش زنجیره پلی‌مراز را در اختیار می‌گذارند. پروبهای ویژه کروموزوم Y و واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) برای تعیین جنسیت جنین به دنبال بیوپسی می‌تواند به طور معمول مورد استفاده قرار گیرند جنینهای بیوپسی شده را به راحتی می‌توان

منجمد نمود، این عمل فایده اقتصادی روشهای تعیین جنسیت را بیشتر می‌کند. در انسان، غالب این اعمال به تشخیص ناهنجاریهای ژنتیکی در جنینهای پیش‌لانه گزینی محدود می‌شود.

تعیین جنسیت جنین

تقسیم‌بندی جنینها بر حسب جنسیت قبل از انتقال به حیوان ماده یا زن گیرنده یک موفقیت مهم در تولید نوزادان با جنس از پیش خواسته است. آنالیز سلولهای مرحله متافاز به دست آمده از بیوپسی جنین گاو در حدود یک دهه قبل پیشنهاد و انجام شد، اما درصد نسبتاً پایین جنینهایی که تولید گسترش متافاز خوانا می‌کنند سودمندی این روش را محدود می‌کرد. محققین دیگر تفاوتهای فعالیت متابولیکی ژنهای کروموزوم X (در مقایسه با کروموزوم Y) یا ظهور فاکتورهای ویژه جنین نر را آزمایش کردند تا جنینهای نر را از ماده تفکیک کنند. جدیدترین روش، از تفاوتهای موجود در DNA به‌دست آمده از بیوپسیهای جنینی استفاده می‌کند. بعضی از این روشها بر اساس پروبهای ویژه Y هستند و بعضی دیگر بر اساس تشدید واکنش زنجیر پلی‌مراز تفریقی ردیف‌های DNA در جنینهای ماده در مقابل جنینهای نر است. به نظر می‌آید استفاده از علامت‌گذارهای DNA برای تعیین جنسیت جنین بسیار دقیق باشد.یک مانع در اجرای این روش آن است که تکنیکهای مخرب بیوپسی جنین مورد نیاز است.

هم اکنون از روشهای تعیین جنسیت جنین، در ارتباط نزدیک با تولید کلونهای جنین به وسیله انتقال هسته استفاده می‌شود. به نظر می‌آید در خواست کاربردی (اقتصادی) برای تعیین جنسیت جنین همراه با انتقال جنین کمتر از آنچیزی باشد که قبل از دستیابی به روشهای تعیین جنسیت پیش‌بینی می‌شد.

سلولهای بنیادی جنینی

سلولهای بنیادی جنینی سلولهای تمایز نیافته‌ای هستند که قابل تبدیل به تمام سلولهای تمایز یافته می‌باشند. آنها در محیط کشت زیاد می‌شوند و قابلیت تمایز یافتن خود را چه در بدن و چه در محیط آزمایشگاه حفظ می‌کنند. مهیج‌ترین مثال از تمایز[18] این سلولها در داخل بدن هنگامی است که آنها به داخل بلاستوسل یک بلاستوسیست تزریق می‌شوند. با این کار یک کایمرای زنده با بافتهایی که هم از سلولهای جنین میزبان و هم از سلولهای تزریقی است به دست می‌آید. سلولهای بنیادی جنینی در موش شباهتهای بسیاری با سلولهای تمایز نیافته ICM و همچنین با سلولهای تمایز نیافته تومورهای واقعی یا تجربی دارند. انتقال و کاشت جنینهای موش به محل‌های غیر طبیعی یک میزبان مناسب از نظر تناسب آنتی‌ژنی (برای مثال بیضه یا زیر کپسول کلیه)، می‌توانند باعث تشکیل تومورهایی با سلولهای بنیادی تمایز نیافته[19] (سلولهای کارسینومای جنینی Embryonal Carcinoma) شود. در سال ۱۹۸۱ دو آزمایشگاه به طور مستقل گزارش کردند که سلولهای تمایز نیافته (از جمله سلولهای بنیادی جنینی) می‌توانند به طور مستقیم از بلاستوسیستها برداشته و کشت شوند.

از سلولهای بنیادی جنینی به طور وسیعی برای تحقیقات مربوط به تکامل جنین و همچنین برای آنالیز کلونی دودمان سلول استفاده می‌شود. اخیراً نشان داده شده است که سلولهای بنیادی جنینی که در آنها انتقال ژنی صورت گرفته برای تحقیقات مربوط به Situ marker[20] مفید است. همچنین مطالعات مربوط به تشخیص مرحله و سلول ویژه مربوط به ژنهای ایمپرینت شده با استفاده از سلولهای بنیادی جنینی انجام شده است. روشهای استفاده از سلولهای بنیادی جنینی برای نوترکیبی هومولوگ[21] یعنی هنگامی که یک لوکوس ویژه[22] در یک DNA مورد تغییر یا جایگزینی قرار گرفته، در حال تکامل است. استفاده از سلولهای بنیادی جنینی برای ایجاد نوترکیبی هومولوگ، به دلیل خاصیت این سلولها در تولید و تکثیر سریع در کشت، توانایی آنها در داخل شدن DNA خارجی و وجود روشهایی برای نشان دادن این دخول و انتخاب موارد مناسب است. از آنجایی که وقوع نوترکیبی هومولوگ در سلولهای پستانداران شایع نیست، روشهای موجود برای عمل مستقیم بروی جنین یا سلولهای جنینی جدا شده بسیار غیر موثر هستند. اما هنگامی که بروی میلیونها سلول بنیادی جنینی کار شود حتی نوترکیبی‌های با درصد وقوع پایین نیز می‌تواند به دست آید. ژنوم تغییر یافته را می‌توان با ترکیب این سلولهای بنیادی جنینی با یک جنین در حال تکامل طبیعی، به داخل سلولهای جنسی[23] اولیه کایمرای حاصل، وارد کرد. همچنین استفاده از سلولهای بنیادی جنینی به عنوان دهنده‌های هسته در تکنیکهای انتقال هسته مورد نظر قرارگرفته و در آزمایشگاههای متعددی در حال بررسی است.

علی‌رغم پتانسیل بسیار بالایی که سلولهای بنیادی جنینی برای مطالعات مربوط به تکامل جنین و تغییرات ژنتیکی در گونه‌های حیوانات اهلی دارند تاکنون این سلولها فقط از جنینهای موش و احتمالاً هامستر جدا شده‌اند. نشان داده شده است که فقط سلولهای بنیادی جنینی تحت خانواده Murine (شامل موش خانگی و موش صحرائی) قادر به تولید کایمراهای Germline هستند. عدم توانایی سلولهای بنیادی جنینی هامستر در تولید کایمراها ممکن است بیشتر مربوط به مشکلات دست‌کاری جنین‌های هامستر باشد تا تفاوت توانایی سلولهای کشت شده. سلولهایی که دارای مورفولوژی و دیگر خصوصیات سلولهای بنیادی جنینی هستند از جنین‌های خوک جدا شده است. همچنین گزارشهایی از مطالعات بسیار محدودتری بروی سلولهای مشتق از ICM از بلاستوسیتهای گوسفند و گاو در دست است. باید مشخص کرد آیا می‌توان سلولهای تمایز نیافته (قابل تبدیل به همهٔ انواع سلولی) را از جنینهای دامها جدا کرده و کشت داد شود. اکثر برنامه‌هایی که تابحال استفاده شده بر اساس روش‌های تکامل یافته جهت جدا کردن سلولهای بنیادی جنینی تحت خانواده murine بوده است. اختلافات متعددی در تکامل جنینی بین گونه‌های جوندگان و سم داران شناخته شده است و شاید لازم باشد که این تفاوتها را در تکمیل روشهای موفق جدا کردن سلولهای بنیادی جنینی از گونه‌های دامها دخالت دهیم.

شکل ۱ شعای استفاده از سلولهای بنیادی جنینی را برای تغییر در سلولهای جنینی اولیه و نیز برای کلونیک هسته نشان می‌دهد.

پاورقی

۱- Micro manipulation – ریزدست‌کاری

۲- Embryonic stem cell

۳- Pronuclear and nuclear transfer

۴- Microsurgical fertilization

۵- Microfertilization .

۶- Perivitelin space، فضای بین سلول تخم و زونا‌پلوسیدا که پس از لقاح ایجاد می‌شود.

۷- Capacitation – ظرفیت‌گیری اسپرم – اسپرم بلافاصله پس از خروج از دستگاه تناسلی نر توانایی بارور کردن تخمک را ندارد و برای به دست آوردن این توانایی باید زمانی را در دستگاه تناسلی ماده یا محیط مخصوص در آزمایشگاه بگذارند که به این توانایی یافتن ظرفیت‌گیری یا مستعد شدن می‌گویند.

۸- Partial zona desection (PZD)

۹- Acrosom reaction – پس از تماس اسپرم با پوشش ژله‌ائی روی تخمک موادی که در این پوشش وجود دارد با غشاء پلاسمائی سر اسپرم ترکیب می‌شود. بواسطه این ترکیب اکروزوم تغییر ماهیت داده و آنزیمهای هضم کننده آزاد می‌کند که اسپرم را قادر به ایجاد سوراخی در لایه‌های احاطه کننده تخمک کرده تا بتواند به سطح تخمک برسد.

۱۰- Cytochalsin-B

۱۱- Imprint

۱۲- Heterogenous premature chromosome

۱۳- Chimera

۱۴- Germ cell

۱۵- Species-specific antigens

۱۶- DNA probing – تکنیکهای نوینی هستند که توالی ژنی را در یک رشته DNA مشخص می‌کنند. از جمله برای فهمیدن دخول یک ژن خارجی به ژنوم میزبان

۱۷- Polymerase chain reaction (PCR) – تکنیک جدیدی است که به وسیله آن می‌توان مقادیر زیادی کپی از قطعات DNA تهیه کرد.

۱۸- differentiation

۱۹- Pluripotent cells

۲۰- Situ marker مشخص کننده‌های خارجی ژنها (مشخص کردن ژنهای یک کروموزم)

۲۱- Homologous recombinant

۲۲- Locus– محل یک ژن خاص بروی کروموزوم

۲۳- Germline

منبع مورد استفاده

Yang, X. and Anderson, G.B, 1992, Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities. Theriogenology, 38:315-335.