

מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

קרן מדען ראשי

תקציר הדו"ח:

בעבודה זו בדקנו מספר שיטות ליצירת עופות טרנסגניים. בתחילת העבודה נבדקה השיטה שהתבססה על החדרת ד.נ.א. לתאים שבגודו מבלסטוציסטים על עוברים תורמים בשלב 8. שהוא השלב בו מצויים העוברים עם הטלת הביצה, והזרקתם לעובר מקבל הנמצא באותו שלב התפתחותי. העובר המקבל מוקרן בקרינת גמא לשם עיכוב התפתחות התאים יוצרי מערכת המין והגברת הסיכוי להכנסת הטרנסגן לתאי המין.

המסקנה מהעבודה שלנו ושל מעבדות אחרות בעולם היא שהד.נ.א. הזר מתבטא בעוברים המוזרקים אבל לא עובר לדור הבא.

שיטה אלטרנטיבית שניסינו היא הזרקה של ד.נ.א. לאשכים של עופות. תוצאות ראשוניות שקבלנו במסגרת עבודה זו נראות מבטיחות ואנו מתכוונים להמשיך ולפתח אותה במסגרת שיתוף פעולה עם מעבדה בארה"ב. הראנו שניתן להחדיר ד.נ.א. לרקמות העוף השלם ושהד.נ.א. מתבטא. הנחתנו היא שבריקמת האשך יש סיכוי לאינסגרציה של ה-ד.נ.א. בחלק מתאי הזרע שמתמיינים באשכים.

סוג דו"ח : מדעי סופי

חוקר ראשי : יהב שלמה

מינהל המחקר החקלאי

חוקרים משניים: הורוץ שמואל
הברפלד אלון

דו"ח מסכם

השימוש בתאים עובריים לצרכי מניפולציות גנטיות ויצירת עופות טרנסגניים

The use of embryonal cells for the production of transgenic chicken

א. מבוא

השיטה ליצירת עכברים טרנסגניים שפותחה בשנות ה-80, הוותה פריצת דרך ששנתה את פני המחקר המדעי. שיטה זו אפשרה בפעם הראשונה ללמוד באופן ישיר ומבוקר על תפקיד גנים ופעילות תוצריהם בחיה השלמה. בעופות פוטנציאל שיטה זו הוא כפול, ניתן לנצל את השיטה הזאת לא רק למטרות מחקר ולגילוי גנים חשובים לגדילה והתפתחות אלא גם למטרות של טיפוח זנים, ולהפקה של חלבונים בעלי חשיבות רפואית כלומר, שימוש בביצה כביו-ריאקטור ליצירת תרופות.

מטרה חשובה זו קשה להשגה בעופות בעיקר בשל חוסר הזמינות של הביצית המופרת ובשל אופיה הפוליסטרמי של ההפריה. השימוש בעופות כימריים כשלב ביניים לקבלת עופות טרנסגניים נראה מבטיח ביותר בתחילת העבודה. מאמץ רב הושקע בכיון זה במעבדתנו ובמעבדות המובילות בעולם. בנסויים אלה הצליחו להחדיר ד.נ.א. זר לעוברים אך לא הצליחו לקבל אינטגרציה של ה-ד.נ.א. הזר לגנום העוף והעברתו לצאצאים (ידע אישי מ: דר. קנט סימקיס, דר. רוברט אצ'ס ו דר' מיצורו נאיטו). מסיבות אלה החלטנו לעבור לשיטה אחרת שבה להערכתנו יש סבירות גבוהה יותר לאינטגרציה של ה-ד.נ.א. הזר לגנום של העוף. הרעיון שלנו הוא להזריק ד.נ.א. בשיטה של jet injection או בהזרקה רגילה לאשכים של עוף. ההנחה היא שה-ד.נ.א. יכנס לתאי האב לפני תהליכי המיזוג ליצירת תאי זרע. מציאותה של מערכת אנזימטית שאחראית לתהליך השכלוף הגנטי בין הכרומוסידות בשלב ה crossing-over יכול להעלות באופן משמעותי ביותר את הסכוי לתהליכי רכומבינציה של ה-ד.נ.א. הזר. הנחתנו היא שגם אם ה-ד.נ.א. הזר לא יעבור אינטגרציה לגנום, מציאותו בתאי הזרע והכנסתו לביצית בזמן ההפריה ע"י תאי הזרע תוכל לחקות בצורה הטובה ביותר את השלב שבו מוכנס ד.נ.א. זר לעכברים טרנסגניים ואשר עד כה נמצא כשלב שבו תדירות האינטגרציה לגנום היא הטובה ביותר. החדרת ד.נ.א. זר לביצית מופרת הינו שלב מאוד לא זמין למניפולציות בעופות בדרכים הקונבנציונאליות. השיטה שאנו מנסים, תוכל לעקוף את המכשול הטכני בעופות. במקביל לעבודה שלנו דווח על הצלחה בהחדרת ד.נ.א. בגישה דומה לשלנו בעכברים. ממצא זה מחזק את ממצאנו ואת האפשרות ליצר עופות טרנסגניים ע"י החדרת ד.נ.א. לאשכים.

ב. סיכום הנסיונות שבוצעו

1. יצירת עופות כימריים

במחצית הראשונה של תקופת הדו"ח התרכזו ביצירת עופות כימריים ע"י הזרקה של תאי blastoderm של עוברים לעוברים אחרים על פי שיטה שפותחה בקנדה. השתמשנו בלהקות רבייה משני גזעים: (WL) White Leghorn ו-(RIR) Rohde Island Red. גזעים אלו הינם טהורים והתקבלו מהמאגר הגנטי של איגוד משקי עופות לרבייה. הודות להבדל בצבע הנצוי של שני הגזעים ניתן לעקוב בקלות אחר צאצאים כימריים שבהם בכל רקמה מצויים תאים מגזע התורם ומהגזע המקבל.

הוקמה מערכת גידול תאי בלסטודרם בתרבית ובוצעו הזרקות לעוברים מוקרנים למטרת יצור עופות כימריים. שני כיווני הזרקה נבחנו – תאי WL לעוברי RIR ולהיפך. בשלב ראשון הוזרקו 246 עוברי RIR, שהוקרנו ברמות שונות של קרינה רדיואקטיבית, בתאי בלסטודרם של עוברי WL. מתוך עוברים אלו, 122 לא הראו כל התפתחות ומתו במהלך השבוע הראשון של ההדגה, 68 מתו במהלך השבוע השני ו-54 במהלך השבוע האחרון. שני אפרוחי RIR מוזרקים בקעו. מאחר ותוצאות אלו מעידות על אחוז הצלחה של פחות מ-1% נבחר כיוון ההזרקה השני (תאי RIR לעוברי WL). בכיוון זה הוזרקו 98 עוברים מתוכם 51 לא הראו כל התפתחות ומתו במהלך השבוע הראשון, 18 מתו במהלך השבוע השני ו-23 במהלך השבוע האחרון. שישה אפרוחים בקעו ו-5 מהם מראים רמות ניצוי כימרי של 5% - 50%. בשיטה זו קיבלנו 6% הצלחה שהוא ערך מקובל במערכות דומות. בנסיון נוסף קבלנו שישה אפרוחים כימריים נוספים מתוך 92 עוברים מוזרקים. השיעור הנמוך של יצירת הכימרות נבע מבקיעה נמוכה (פגיעה בהתפתחות העוברית) ולא מהתפתחות של אפרוחים שאינם כימרים (רק שלשה אפרוחים שאינם כימריים התקבלו בנסוי זה).

שניים מהעופות הכימריים שיצרנו מוצגים באיור 1. כפי שמודגם באיור 1, החדירות של הגזע התורם שונה מכימרה לכימרה אך ניתן לזהות את הכימרות בודאות.

2. גידול עוברים בביצים פונדקאיות

בגלל אחוזי הבקיעה הנמוכים שקבלנו ובעקבות ממצאים שהתפרסמו בספרות העולמית במהלך תקופת המחקר הוחלט על שינוי באופן הטיפול בביצים המוזרקות כדי לנסות ולשפר את אחוזי הבקיעה. לצורך זה פותחה מערכת גידול עוברי תרנגולות בביצים פונדקאיות, מאחר ונימצא כי העברת העובר המוזרק לקליפה פונדקאית ביום 4 להדגרה משפרת את סיכוייו לשרוד (הברפלד וחוברי, 1995). מערכת זו נוסתה ונבחנה מספר גורמים העשויים לשפר את הבקיעה. להלן, בקצרה, תאור מערכת הגידול:

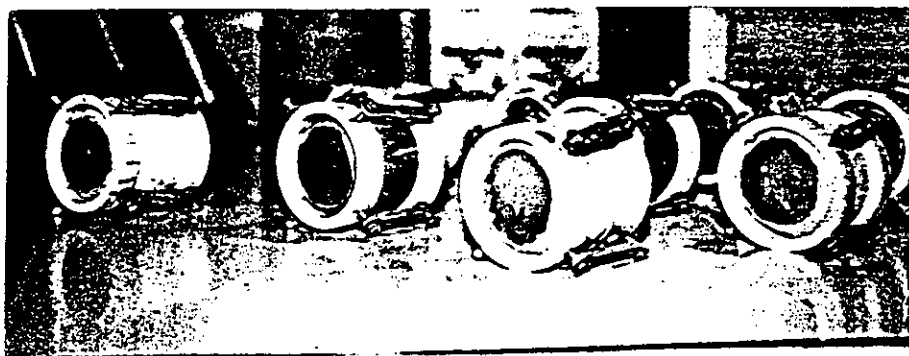
1. ביצים פוריות נאספו מיד לאחר ההטלה, נשקלו, נשטפו ב-70% אתנול והועברו למינדף סטרילי במעבדה.
2. קליפות פונדקאיות הוכנו מביצים לא פוריות שנאספו בלול באותו שבוע: הביצה הפונדקאית הראשונה היתה כבדה ב-3-5 גרם מהביצה המקורית כדי להגיע לנפח ביצה זהה לזה של הביצה המקורית לאחר חיתוך הקצה. היא נפתחה, לאחר ניקוי באתנול, ע"י חיתוך הקצה החד ותכנה סולק.
3. תוכן הביצים הפוריות (העובר, החלמון והחלבון) הועבר לקליפה הפונדקאית והיא נאטמה בעזרת פיסת ניילון ניצמד וטבעות אטימה.
4. העוברים הודגרו בקליפה הפונדקאית הראשונה במשך שלשה ימים בטמפרטורה של 37.7 מ"צ ובלחות יחסית של 55% במדגרה סטנדרטית (65 Digit HS של חברת Masalles, ספרד) (איור 2 א')
5. ביום הרביעי להדגרה הוכנה עבור כל עובר מתפתח הקליפה הפונדקאית השניה מביצים הכבדות ב-20-25 גרם מביצים המקוריות.



אזור 1 : א. אפרוח כימרי בן שבוע (שמאל) לצידו אפרוח מרהגוע המקבל (מרכז) ואפרוח מרהגוע התורם (ימין).
 ב. האפרוח הכימרי מאחור. ג. תרעולת כימריה אחרת, בגיל חצי שנה.

6. העוברים הועברו מהקליפה הפונדקאית הראשונה לשניה והביצים נאטמו בעזרת נילון ניצמד (איור 2 ב').
7. הביצים הודגרו באותם תנאי הדגרה כשחן ניצבות על הקצה החד. המדגרה כוונה לזווית הטיה של 60° בלבד. 8. ביום ה-18 להדגרה הועברו הביצים לתאי בקיעה והיריעה האוטמת חוררה העזרת מחט סטרילית (איור 2 ג').

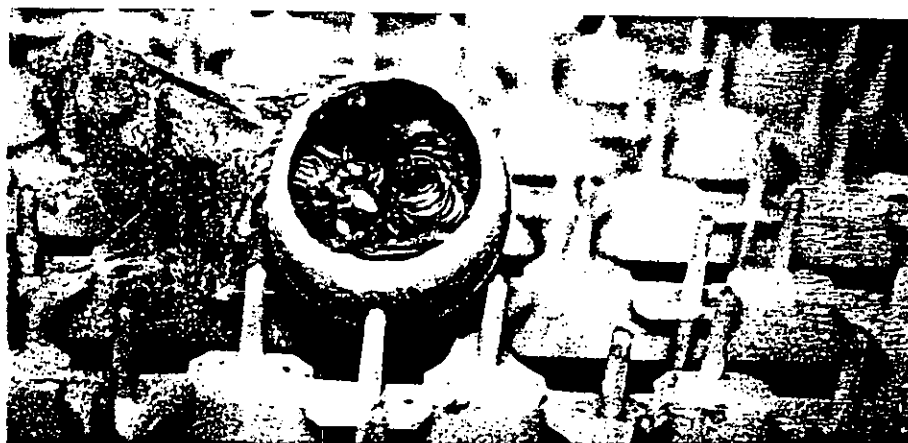
אחוזי הבקיעה שהשגנו בשיטה זו במעבדתנו הינם כ-30% בדומה למעבדות אחרות בעולם.



א'



ב



ג

איור 2 : התפתחות עוברית בביצים אומנות. א, ביצים אומנות ראשונות עם עוברים ביום אפס. ב, ביצים אומנות שניות עם עוברים בגיל ארבעה ימים. ג, יום 21, האפרוח מוכן לבקיעה.

3. החדרת ד.נ.א. זר לתאי בלסטודרם לפני החדרתם לעוברים

כדי לבדוק את האפשרות להחדת גנים זרים לעוברים של עופות הוכן וקטור המכיל גן קל לזיהוי - גן המדווח (איור 3). הגן המקודד לאנזים β -גלקטוזידאז הושם תחת הבקרה של הגן המקודד לאקטין בעוף. רצפי הבקרה של הגן לאקטין של עוף אופינו בעבר, ונמצאו כיעילים ביותר להשריית בטוי של גנים אקסוגניים *in vivo* בעכברים טרנסגניים.

תאי בלסטודרם שהתקבלו כפי שתואר לעיל, נזרעו על צלחות במדיום DMEM ב- אינקובטור עם 5% CO₂ ב- 37°C. אחרי 24 שעות התאים נשטפו בבופר פוספט והודגרו למשך 30 דקות עם DMEM וליפופקטין בריכוז 12.5 מקרוגרם למיליליטר. ד.נ.א. הוסף בריכוז של 3 מקרוגרם למיליליטר והתאים הושארו להדגרה נוספת של 3.5 שעות. ההדגרה הופסקה ע"י הוספה של FCS ביחס של 10% מהנפח. אחרי כ-48 שעות עברו התאים בדיקה לבטוי הטן הזר ע"י צביעה בסובסטרט x-gal, הצביעה הראתה שכ-30% מהתאים בתרבית הראו התבטאות של תוצרי הגן. בשלב שני חזרנו על תהליך החדרת ה-ד.נ.א. לתאים ומיד אחרי הוספת ה- FCS התאים הוזרקו לעוברים כפי שתואר לעיל. נבחנו 143 עוברים בני 3 ימים שהוזרקו בתאים שעברו טרנספקציה ביום אפס. שישה מהעוברים הראו התבטאות של הגן החידקי הזר באיזור מערכת העצבים המרכזית ובאיזור הראש. בנסוי נוסף שבו אפשרנו לעוברים לגדול בביצים אומנות ולבקוע הצלחנו לקבל שני זכרים. כשהזכרים הגיעו לבגרות מינית (גיל שישה חודשים), הוצאנו זרע ובדקנו את נוכחות הגן ל- β -גלקטוזידאז בזרע גם ע"י צביע ב-x-gal סריקה תחת מקרוסקופ אור וגם ע"י PCR עם פרימרים מתאימים לרצף של הגן. בשתי השיטות לא ניתן היה למצא תאים שמכילים את הגן הזר. במקביל לתוצאות שלנו, הסתבר שבנוסף לנו קבוצות מובילות בעולם שניסו את השיטה באינטנסיביות רבה גם כן לא הצליחו לקבל צאצאים טרנסגניים בדור השני של הכימרות, כפי שהתברר לנו בשיחות עם:

Dr. K. [and . במהלך כינוס ביו-לאומי "Avian Endocrinology"

שהתקיים בקנדה באפריל 1996.

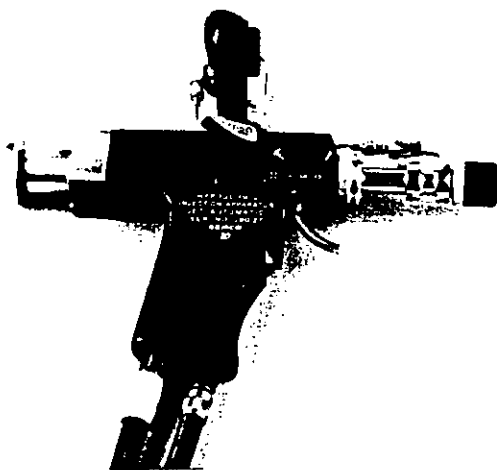
4. הזרקה של ד.נ.א. לאשכים בעזרת Jet Injection

במחצית השניה של תקופת הדוח התחלנו בגישה נוספת לקבלת עופות טרנסגניים בעקבות דווחים על אי ההצלחה של השיטות הקיימות. החלטנו לנצל מכשיר Ped-O-Jet injector (Stirn Industries, Dayton, NJ) המתואר באיור 4. מכשיר זה, שמשמש במקור כאקדח חיסונים, הותאם בשנים האחרונות להחדרת ד.נ.א. לרקמות למטרות מחקר ולרפוי גנטי ביונקים ().

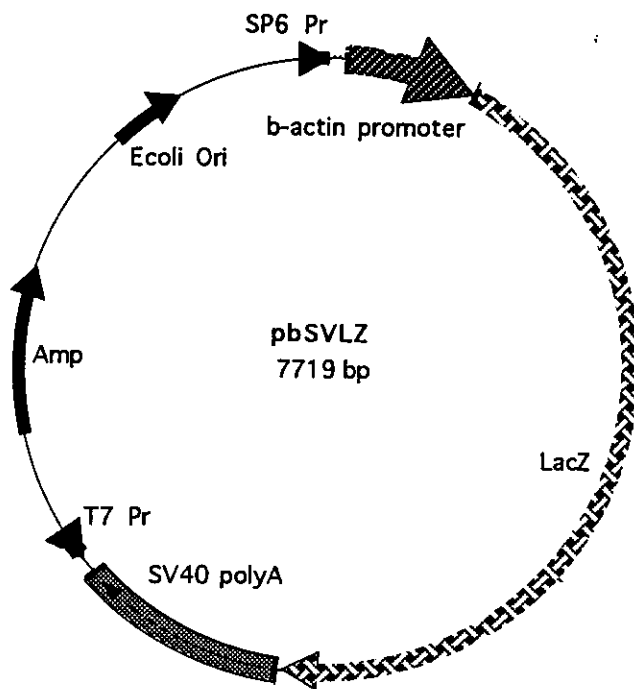
אנו החלטנו לנצל את השיטה להחדרה של ד.נ.א. לתאי האב שיוצרים את תאי הזרע באשכים.

בניסיון ראשון השתמשנו ב-10 זכרים, מהם 5 מזן לגהוזן ו-5 מזן RIR לפני הניתוח הרעבנו את התרנגולים למשך 16 שעות. ההרדמה נעשתה ע"י הזרקת 45 - 60 מ"ג נמבוטל לק"י משקל גוף. בגלל הרגישות הרבה לחומר ההרדמה, הזרקת חומר ההרדמה נעשתה בהדרגה. בעזרת סקלפל פתחנו פתח ברוחב של כ-3 ס"מ בחלקו הצידי של הגוף מתחת לצלעות וחזרנו דרך רקמת השריר לחלל הבטן. כשמערכת העיכול ריקה ניתן בדרך זו לזהות בבירור את האשך ולקרב את המזרק למרחק של כ-1.5 ס"מ ממנו. לכל אשך הזרקנו שלש עד ארבע הזרקות בנפח של כ-150 מיקרוליטר. אחרי כל הזרקה בדקנו את דיוק ההזרקה על פי פגיעה קלה שראתה על פני האשך.

גם בניסיונות אלה השתמשנו בקונסטרוקט שמכיל את הגן המדווח β -גלקטוזידאז ושמתואר באיור 3.

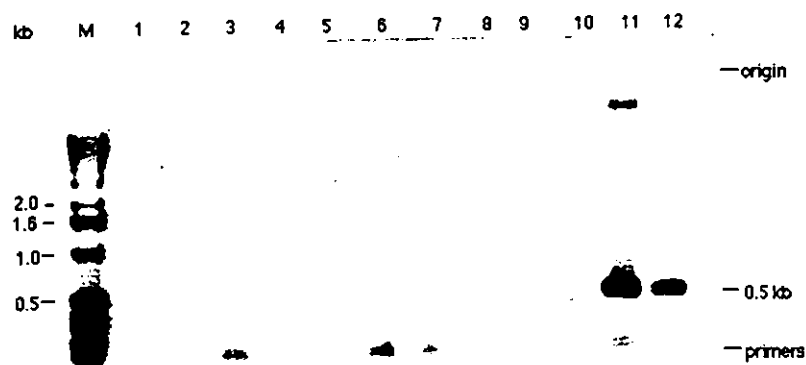


איור 4: Ped-O-Jet injector
(Stirn Industries, Dayton, NJ)



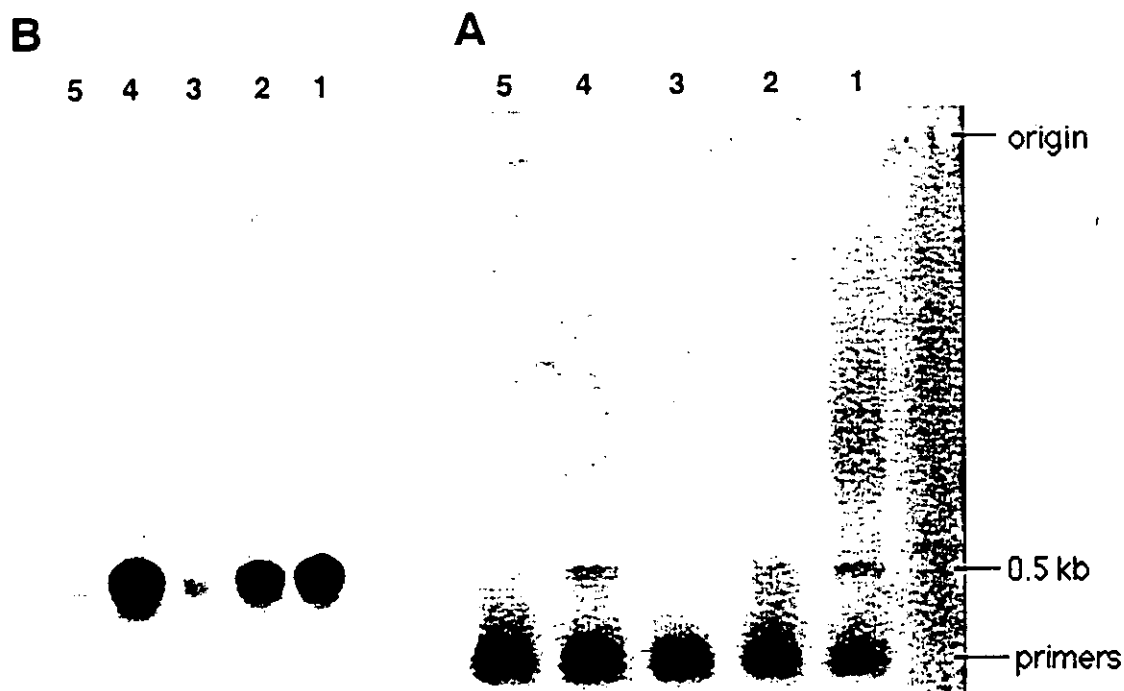
איור 3: תאור סכמתי של הקונסטרוקט
שבו השתמשנו להזרקת ה-DNA. לאשכים.

הזרקנו את הפלזמיד בריכוז של 1 מיקרוגרם למיקרוליטר בבופר TE (1 mM Tris - 0.1 mM EDTA). שלשה עופות מתו בזמן הניתוח כנראה בגלל רגישות לחומר ההרדמה. שלשה עופות נוספים לא התאוששו מהניתוח ונפטרו במהלך היממה שאחרי הניתוח. חמישה מששת העופות שנפטרו היו מזן WL. למרות המדגם הקטן ניתן להניח שעופות מזן RIR יציבים יותר לטיפול זה. אחרי שבוע של התאוששות התחלט לחלוב זרע מהעופות המוזרקים ומעופות ביקורת ולבדוק את האפשרות שהפלזמיד שהזרקנו לאשכים חדר ונשמר בתאי הזרע. איסוף הזרע נעשה אחת לשבוע במשך כ-7 שבועות. מכיוון שאנו מצפים שרק חלק קטן מתאי הזרע יכילו את ה-DNA, המוזרק, הבדיקות בשלב ראשון נעשו בשיטה של PCR. הפרדנו את תאי הזרע מנוזל הזרע, ואחרי שטיפה ב-PBS הפקנו DNA. מתאי הזרע. השתמשנו ב-0.25 מיקרוגרם DNA. מכל דוגמה ל-PCR. מנוזל הזרע לקחנו דוגמאות של 5 מיקרוליטר. הפריימרים תוכננו על ידנו על פי הרצף הידוע של הגן ל- β -גלקטוזידאז. גודל מקטע ה-DNA. הצפוי מראקציה ה-PCR עם הפריימרים שהכנו הוא 0.5kb. איור 5 מתאר תוצאות ראשוניות של האנליזה. תוצרי הראקציה הוטענו על 1% ג'ל אגרוז ונצבעו באטידיום ברומיד. כפי שניתן לראות בנסוי זה לא התקבל סיגנל. כביקורת ל-PCR, השתמשנו בפלזמיד ששימש להזרקת (50 ננוגרם ו 5 ננוגרם). הבקורת החיובית הראתה שתאי הראקציה היו מתאימים והראגנטיים עבדו טוב. איור 6 מראה בדיקות שנעשו באותו אופן על דוגמאות מעוף מס' 1. עוף זה נותח ב-28.7.96. מקטעי DNA. בגודל הצפוי התקבלו בשבוע הראשון, השני והרביעי לניתוח (בארות 1, 2 ו 4 בהתאמה). לא נמצא סיגנל בשבוע השלישי ובשבוע השביעי לניתוח (בארות 3 ו 5 בהתאמה). כדי להגדיל את הרגישות עוד יותר, ולקבל ראיה נוספת לגבי זהות הסיגנל שהתקבל, בלוט שנעשה על הג'ל באיור 6 אי עבר הברידיזציה לפרוב רדיואקטיבי של β -גלקטוזידאז. האוטורדיוגרם, המוצג באיור 6-ב, מאשר את התוצאות שנראו באטידיום ברומיד. בבלוט זה התקבלו פסים בהתאם לפסים שנראו בצביעה באטידיום ברומיד. מכיוון שהשטיפות אחר הברידיזציה נעשו בתנאים מחמירים ניתן להניח שהפרגמנט שהתקבל מכיל את הרצף של הגן ל- β -גלקטוזידאז.



איור 5 : צביעה באטידיום ברומיד של מקטעי ד.נ.א. שעברו אמפליפיקציה ב-PCR עם פריימרים המתאימים לגן המקודד לאנזים β -גלקטוזידאז. דוגמאות ד.נ.א. מעופות מוזרקים מסי' 3 ו 4 שנאספו במהלך 4 שבועות מזמן הניתוח : בבאות 1 עד 4 הוטענו דוגמאות מעוף מסי' 3 (שבוע ראשון, שני, שלישי ורביעי אחרי הניתוח, בהתאמה) בבאות 5 עד 8 הוטענו דוגמאות מעוף מסי' 4 באותו סדר. בבאות 9 ו 10 הוטענו דוגמאות של נוזל זרע מהחליבה הראשונה אחרי הניתוח של עופות מסי' 3 ו 4, בהתאמה. בבאות 11 ו 12 הוטענו דוגמאות מ-PCR שנעשה על 50 ו 5 ננוגרם פלסמיד, בהתאמה.

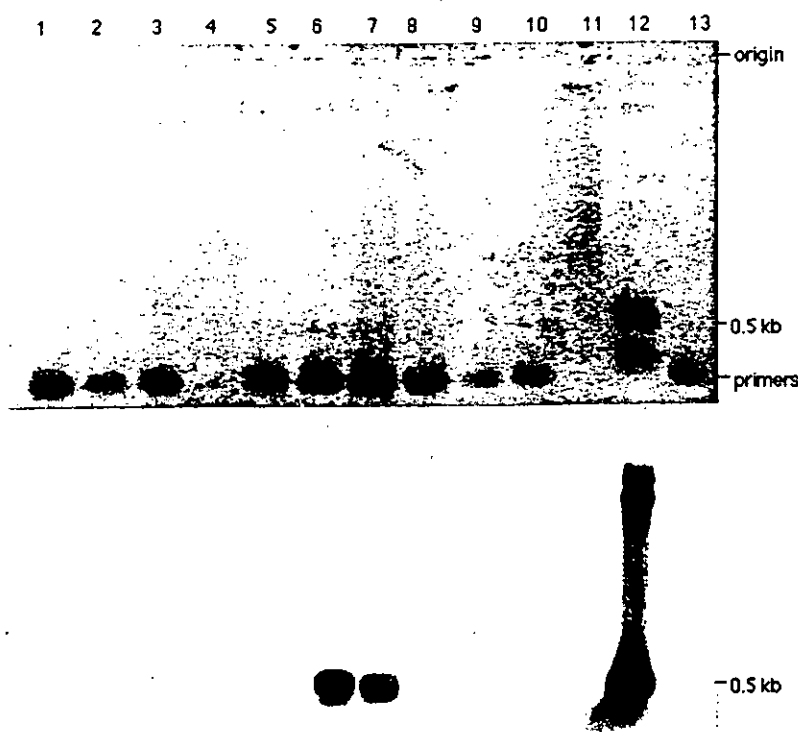
M - מרקרים להערכת גודל תוצרי ה-PCR.



איור 6 : א דוגמאות מעוף מספר 1 מהשבוע הראשון, השני, השלישי, הרביעי והחמישי אחרי הניתוח (באות 1 עד 5, בהתאמה). ב אנליזה של הבלוט שהופק מהגל המוצג בהברידיזציה לפרוב רדיואקטיבי של β -גלקטוזידאז.

באיור 7 נעשתה אנליזה דומה לעופות מספר 3 ו 4. התקבל סיגנל חלש מאוד בעוף מס' 3 בשבוע השני והשלישי לניתוח. סיגנל זה אומת בהברידיזציה של בלוט שהוכן מגל זה ועבר הברידיזציה לפרוב של β -גלקטוזידאז (איור 7-ב).

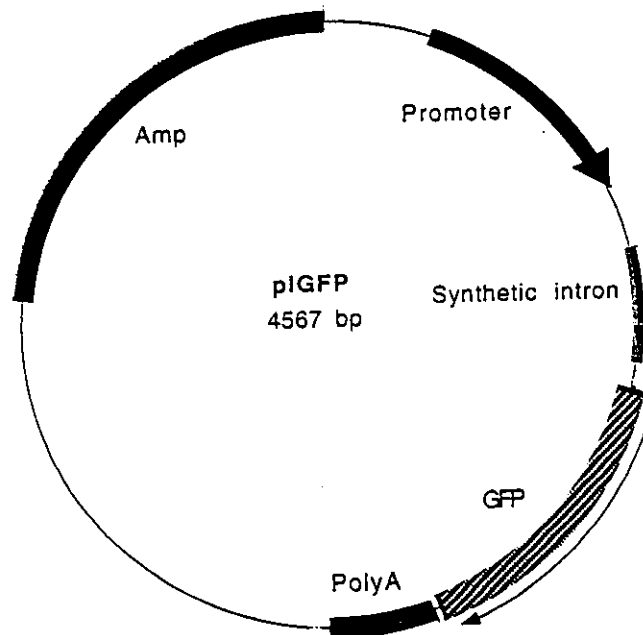
למרות שהביקורות השליליות היו שליליות לא ניתן בשלב זה לקבוע בביטחון שהסגנלים שקבלנו בזרע נובעים ממעבר לזרע של ה ד.נ.א. שהזרקנו לאשכים. זאת בעיקר משום שהשיטה של PCR טובה לסקירה ראשונית אך יש לאמת את התוצאות בשיטות נוספות.



איור 7 : דוגמאות מעופות מספר 2 ו 3. בבאר 1 הוטענה ביקורת ללא ד.נ.א; בבארות 2-5, הוטענו דוגמאות מעופות ביקורת שלא נותחו. בבארות 6, 7 ו 8, הוטענו דוגמאות מעוף מס' 2 שנאספו בשבוע השני, השלישי והרביעי אחרי הניתוח, בהתאמה. בבארות 9, 10, 11 ו 13, הוטענו דוגמאות מעוף מס' 3 (חזרה על חלק מהאנליזה הקודמת (איור 5); בבאר 12 הוטענה דוגמת PCR עם הפלסמיד ששימש להזרקה.

5. הכנת מדרוזת פלורסצנטית GFP

הבעיה העיקרית בתוצאות שתוארו לעיל היא האמינות של שיטת הדטקציה של הטרנסגן. הרגישות הגבוהה של PCR והיכלת לגלות כמות קטנות של ד.נ.א. מהווה גם את היתרון וגם את החסרון של השיטה מכיוון שהסכוי לקבל סגל חיובי בגלל זיהום גדול בשיטה זו יחסית לשיטות אחרות. לכן עברנו לנן מדרוזת שהתגלה לאחרונה, שהוא בעל רגישות רבה מאוד וניתן לראותו בעזרת מקרוסקופ פלורסצנטי גם כשהוא מתבטא רק בתא אחד בשדה. נן זה בודד ממדרוזות והיכלת הפלואורסצנטיות שלו שופרה באמצעים של הנדסה גנטית. את הגן רכשנו מחברת Clontech הקונסטרוקט המקורי נקרא IRIS-GFP וכדאי להתאימו לצרכים שלנו חתחנו באנזים BamHI להוצאת ה- IRIS ועשינו ליגציה של הקונסטרוקט ללא האנסרט. תאור סכמתי של התוצר הסופי מתואר באיור 8.



איור 8: תאור סכמתי של הקונסטרוקט CMV-GFP

בדיקה לפעילות הגן נעשתה בשלב ראשון ע"י טרנספורמציה לתאי עכבר. כ-48 שעות אחרי טרנספורמציה לפברובלסטים של עכבר (תאי NIH-3T3) הראו יותר מ-50% מהתאים בצלחת פלורסנציה חזקה במקרוסקופ פלואורסנטי. מכך הסקנו שהקונסטרוקט פעיל.

6. הזרקה של הגן הפלורסצנטי לאשכים

כדי לבדוק בטוי של נן זה באשכים של עופות הזרקנו בשיטה של Jet Injection שתוארה לעיל את הקונסטרוקט החדש. ההזרקה נעשתה לחמישה זכרים. בדיקת האשכים נעשתה שבוע (זכר 1, 2, 3) שבועיים (זכר 4 ו 5) ושלושה (זכר 6). בחלק מהמקרים, כשפתחנו את העופות, גילינו שהאשך המוזרק התנוון, (עופות 3, 4 ו 6) האשכים שלא התנונו נחתכו עברו הקפאה וחיתוך במקרוטום, וסקירה תחת המקרוסקופ הפלורסצנטי. בנוסוי זה לא התקבלו חתכים שנתנו סיגנל פלורסצנטי. סקירה של כל החתכים באופן שיטתי תחת המקרוסקופ גזלה שעות רבות מאוד, זאת בעיקר משום שקשה היה לזהות בברור את מקום ההזרקה של הד.נ.א. מסיבה זו וגם בגלל התדירות הגבוהה של אשכים שנפגעו פגיעה פיזית מההזרקה החלטנו לבדוק את השיטה קודם בהזרקה לשריר שהיא קלה

יותר וקל גם לסמן את מקום ההזרקה. בשריר החלטנו להשוות בין הזרקה רגילה במזרק ל- "השפצה" בכשיר Ped-O-Jet injector

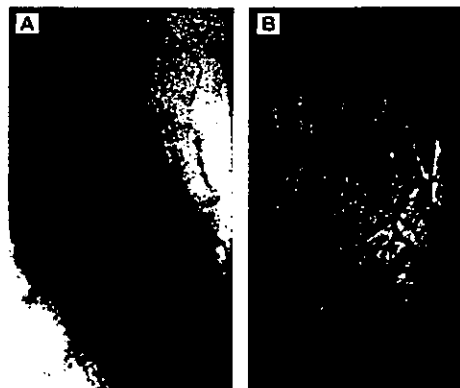
7. הזרקה של Chicken β -actin LZ ו CMV-GFP לשריר של עופות

לנסוי זה השתמשנו ב- 10 אפרוחים בני שבועיים. ל-5 מהם הזרקנו לשריר אחרי פתיחת העור ובשאר העופות הזרקנו דרך העור וסימנו את מקום ההזרקה בדיו מיוחדת (indian ink). בשני עופות מתוך אלה שעברו פתיחת עור הזרקנו לשריר החזה מצד אחד בעזרת מזרק, ובצד השני בעזרת ה- Ped-O-Jet injector.

השתמשנו להזרקה בתמיסה שמכילה תערובת של שני קונסטרוקטים: CMV-GFP ו Chicken β -actin LZ ביחס מולרי 1:1. אחרי 10 ימים נלקח האיזורים המוזרקים מהעופות, ועברו פיקסציה של שעתיים בפרהפורמאלדהיד והשריה של ON ב- X-Gal. באחד מהעופות הזרקנו רק את הקונסטרוקט Chicken β -actin LZ.

את האיזורים שנצבע בכחול חתחנו במקרוטום בהקפאה ובדקנו את החתכים במקרוסקופ פלורסצנטי. כפי שניתן לראות באיור 9 שני הגנים הזרים התבטאו באיזורים המוזרקים. בעוף שאליזו הזרק רק הקונסטרוקט Chicken β -actin LZ לא היה סיגנל פלורסצנטי.

הזרקת שני הקונסטרוקטים יחד אפשרה לאתר במדויק את מקום ההזרקה ע"י צביעה ב- X-Gal שניתנת לאבחון בעיין, ולחתוך במקרוטום רק את איזור זה. אבחון הסגנל של שני סמנים בלתי תלויים מחזק מאוד את ההנחה שמדובר בבטוי ספציפי של הגנים הזרים. בהשוואה עם ההזרקה ב- Ped-O-Jet injector נראה שההזרקה במזרק נתנה תוצאות טובות יותר כנראה בגלל הפגיעה הרבה יותר ברקמה שנגרמת בשימוש ב- Ped-O-Jet injector. יתכן שכיול טוב יותר של עוצמת ההזרקה דרוש לפני שמגיעים למסקנה סופית. מנסיונות ראשוניים אלה נראה שניתן להחדיר ד.נ.א. לרקמות של העוף השלם ושיש טעם להמשיך ולבדוק האם בשיטה זו ה-ד.נ.א. יעבור איטגרציה לגנום ויוכל להיות מועבר מדור לדור.



איור 9: בטוי גנים שהוזרקו לשריר שבוע אחרי ההזרקה.
א. צביעה ב- X-Gal לבדיקת בוי של האנזים β -גלקטוזידאז. ב. צילום חתך מהאיזור שנצבע ב- X-Gal תחת מקרוסקופ פלורסצנטי.

ג. מסקנות והשלכות לעתיד

בשנה וחצי הראשונות של עבודה זו בדקנו שיטה ליצירת עופות טרנסגניים במקביל למעבדות נוספות. השיטה שהתבססה על החדרת ד.נ.א. לתאים עוברים ללא סלקציה והזרקתם לעוברים, נראתה מבטיחה כי מעבדות מקדימות הראו שגנים שהוכנסו בדרך זו התבטאו בעוברים המוזרקים. הנתונים שלנו ושל המעבדות האחרות שנעשו במקביל הראו שלמרות שהטרנסגנים התבטאו בעוברים בכימריים, הם לא עברו לדור הבא.

², ידע אישי

בכל העבודות, תאי המין לא היו כימריים והכילו רק תאים של העוף המקבל. המסקנה המקובלת כיום היא שהשיטה לא יכלה להיות שיטה ליצירת עופות טרנסגניים. שיטה זו תוכל להיות יעילה בעתיד במידה וניתן יהיה לקבל קו של תאים עוברים של עוף בדומה ל-ES cells בעכבר ואשר ניתן יהיה להחדיר אלהם ד.נ.א. בתרביית ובתהליך של סלקציה לקבל תת-קו של תאים שבהם ה-ד.נ.א. שהוחדר עבר אינטגרציה לגנום. הזרקה של תאים עוברים כאלה לעובר של עוף בשיטות שאותן ניסינו בעבודה זו, תוכל כן להיות שיטה יעילה ואמינה לקבלת עופות טרנסגניים כי ה-ד.נ.א. בהם יעבור אינטגרציה לגנום לפני ההזרקה. שיטה אלטרנטיבית שניסינו היא הזרקה של ד.נ.א. לאשכים של עופות. שיטה זו נוסתה במקביל בעכברים במעבדה אחרת ³, והיא נמצאת עדיין בשלבי פיתוח ראשוניים. השיטה נראת לנו מבטיחה ואנו מתכוונים להתשיך ולפתח אותה במסגרת שיתוף פעולה עם מעבדה בארה"ב. הראנו שניתן להחדיר ד.נ.א. לרקמות העוף השלם ושהד.נ.א. מתבטא. הנחתנו היא שבריקמת האשך יש סכוי לאנטגרציה של ה-ד.נ.א. בחלק מתאי הזרע שמתמיינים באשכים.

ד. סיכום מדעי של הדיווח

בעבודה זו בדקנו את השיטות ליצירת עופות כימריים כשלב ביניים ביצירה של עופות טרנסגניים והתחלנו בגישה נוספת שהיא הזרקת ד.נ.א. לאשכים. במהלך העבודה זו הסתבר הן מעבדות שלנו והן מעבדות של אחרים שהחדרת ד.נ.א. לתאים עוברים (בלסטוציסטים או PGC's) אכן ניתנת לביצוע אך לא ניתן בשלב זה לקבל אינטגרציה של ה-ד.נ.א. הזר לגנום. המסקנה המקובלת היום שנובעת מעבודות שלנו ושל אחרים היא שיצירת עופות כימריים תהיה חשובה ושימושית ביותר רק כאשר תהיה בידנו שורת-תאים עוברים (embryonal cell line) שניתן לגדלם במעבדה. לשורת התאים ניתן יהיה להחדיר ד.נ.א. עם סמן סלקטיבי ולעשות סלקציה לתאים עוברים שבהם ה-ד.נ.א. עבר אינטגרציה לגנום. יצירת כימרות ע"י החדרת תאים עוברים אלה תהיה אז יעילה ביותר לקבלת עופות טרנסגניים. השיטה לקבלת שורת תאים כאילה נמצאת בפיתוח (1996). אך עדיין לא הוכחה יעילותם של התאים למטרה זו.

בשנה וחצי האחרונות של מחקר זה, התחלנו בפיתוח של שיטה אלטרנטיבית להחדרת ד.נ.א., בשיטה של

jet injection (.) ובהזרקה חד פעמית במזרק. בשיטה של jet injection

הצלחנו להראות נוכחות של ד.נ.א. בתאי זרע אך זאת רק בשיטה של PCR ולכן אנו זהירים ביותר בהסקת המסקנות. כדי לאפשר זהו בשיטה אמינה יותר ובעלת רגישות דומה הכנו וקטור חדש שמכיל גן מדווח פלואורסנטי שבוודד לאחרונה ממדוזה enhanced green fluorescent protein תחת הבקרה של פרומטר וירלי CMV. נסיונות ראשוניים עם קונסטרוקט זה הראו שניתן לקבל בטוי בעוף בהזרקה רגילה לשריר. באשכים מצאנו שבשיטת ה-jet injection הפגיעה באשכים גדולה וגורמת במקרים רבים לניוונים. בנסיונות ההמשך כונתנו להזריק לאשכים בהזרקה לתוך האשך במזרק. השימוש בגן מדווח פלורסנטי יאפשר העשרה של תאי הזרע הפלורסצנטיים העזרת מכשיר Fluorescent Activator Cell Sorter (FACS) שמופעל ביחידה לשרותים ביולוגים של מכון ויצמן. בדרך

3. סיכום חדש לדוחות מחקר 1997

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. תודה.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

פיתוח שיטות איכותיות אופטימליות לזיהוי מיקרוביאלים, טיפול בנזקים
ושימוש בביטול כבד-1-2/97 איכות מחולפת

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.

א. גאומטריה ממוצעת איכות אופטימלית כמחיר
ב. הוצאת ממוצעת אופטימלית אופטימלית אופטימלית
ג. גאומטריה ממוצעת אופטימלית אופטימלית - מחיר הבין

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

א. אופטימלית ניהולית יעילה יותר. אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית
ב. אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית
ג. אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית

4. הבעיות שנתקו לפתרון ואם השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים);
התייחסות המשך המחקר לגביהן.

א. יש אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית
ב. אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית
ג. אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית אופטימלית

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה,
פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.