



## Creation of a lentiviral recombinant construct containing the *PDX1* gene using the CRISPR/Cas9 system

Akhlaghpour A<sup>a</sup>, Basiri M<sup>b</sup>, Mobarak Qamsari M<sup>c</sup>, Hassani SN<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> p.h.D., Department of Stem Cells and Cancer, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

<sup>b</sup> p.h.D., Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>c</sup> p.h.D., Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

<sup>d</sup> p.h.D., Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Akhlaghpour A, Basiri M, Mobarak Qamsari M, Hassani SN. Creation of a lentiviral recombinant construct containing the *PDX1* gene using the CRISPR/Cas9 system. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(3):277-290.

doi <https://doi.org/10.61882/JCT.277>

### KEYWORDS

CRISPR-Cas system  
Gene editing  
Lentivirus  
RNA Guide

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Homeodomain transcription factor 1 (PDX-1) is necessary for proper pancreatic development and  $\beta$ -cell function. The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) system, in conjunction with CRISPR-associated protein 9 (Cas9), facilitates modifications, particularly deletions, within the genome. The use of lentiviral vectors for gene transfer to somatic stem cells has increased significantly. They harbor advantageous features, including a relatively high gene loading capacity, a diminished likelihood of gene expression silencing following integration into the genome, and high efficiency in delivering genes to a variety of target cells. Furthermore, they elicit no undesirable immune reactions and offer a broad selection of alternative envelope proteins.

**Aim:** This study aims to introduce a mutation in the chicken *PDX-1* gene. A guide RNA (gRNA) will be designed to complement a specific region of the *PDX-1* gene. This approach aims to create targeted mutations with potential therapeutic applications in gene therapy.

\* Corresponding author. Tel: +989125868816, +98 21 22306485, Fax: +98 21 23562507.

E-mail address: [snafiseh.hassani@royaninstitute.org](mailto:snafiseh.hassani@royaninstitute.org)

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.277>

Received: 10 Apr. 2025; Received in revised form: 16 Aug. 2025; Accepted: 17 Aug. 2025

Original Article

© Author



**Materials and Methods:** The PDX-1 gene was cloned using the LentiCRISPRv2GFP vector. To delete and modify the PDX-1 gene, a specific single guide RNA (sgRNA) sequence is designed. This sgRNA sequence is approximately 100 base pairs (bp) in length, with about 76 bp derived from the scaffold segment already integrated into the LentiCRISPRv2GFP vector.

The region responsible for binding the sgRNA to the target genomic sequence is 20 nucleotides long and is complementary to 20 nucleotides in exon one of the PDX-1 gene. The CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu>) was used to design a specific sgRNA sequence targeting the PDX1 locus (sgPDX1).

The double-stranded oligonucleotide fragment and the LentiCRISPRv2GFP vector were subjected to enzymatic digestion using the *BsmBI* restriction enzyme. To create the LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1 vector, the cleaved sgPDX1 sequence was joined with the cleaved vector. This was accomplished by mixing the vector and nucleotide fragment and subjecting them to a ligation reaction using the T4 ligase enzyme. The resulting vector contains a transcript of the sgRNA, specifically sgPDX1.

The heat shock method was employed to transform *Escherichia coli* Top10 host cells with the cloned LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1 vector. To confirm the presence of the *sgPDX-1* gene in the vector, a polymerase chain reaction (PCR) was conducted using primers targeted at a portion of the U6 promoter sequence (forward primer) and a segment downstream of the sgRNA gene region (reverse primer). Additionally, each PCR product was analyzed using enzymatic digestion with EcoRV and *BsmBI* enzymes. To confirm the successful cloning, the PCR product was sequenced.

**Results:** The PCR results showed an amplified fragment measuring 267 base pairs (bp), which indicated the presence of the *sgPDX-1* gene. This was visualized on an agarose gel. Additionally, the reverse digestion with two restriction enzymes produced a 2000 bp fragment isolated from the vector. The sequencing results confirmed that the cloning process was successful.

**Discussion:** Genome editing technology has been highlighted in bird species due to their significant potential for economic production and creating models for biological research. The application of CRISPR gene editing technology in avian research has yielded promising advancements, particularly in the modification of somatic cells and tissues in birds. By precisely targeting primordial germ cells (PGCs), researchers can implement specific genetic modifications within the chick genome, thereby facilitating the development of genetically edited chicks. Numerous studies have investigated the role of the *PDX-1* gene in gene therapy using the CRISPR/Cas9 system across various organisms. However, this study is the first to design and produce a recombinant construct containing the chicken *PDX1* gene using a lentiviral vector with the CRISPR/Cas9 construct. This advancement aims to create a practical research platform for future studies by enabling the direct transfer of this recombinant construct into chick embryos and cells.

**Conclusion:** The chicken *PDX-1* gene was cloned into a lentiviral vector containing the CRISPR/Cas9 construct. The recombinant vector LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1 was successfully obtained. The gene construct developed in this study has significant potential for investigating gene function and for use in gene therapy. Consequently, utilizing this construct may enable the creation of an animal model in chicken embryos featuring defects, including an empty organ or tissue cavity. Such a model will allow for the investigation and treatment of the defects using specific drugs and cell lines.



## ایجاد یک سازه لنتی ویروسی نو ترکیب حاوی ژن *PDX1* کلون شده با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9

عظیمه اخلاق پور<sup>۱</sup>، محسن بصیری<sup>۲</sup>، مریم مبارک قمصری<sup>۳</sup>، سیده نفیسه حسنی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup>استادیار، گروه سلول‌های بنیادی و سرطان، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.  
<sup>۲</sup>دکتری تخصصی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، تهران، ایران  
<sup>۳</sup>استادیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران  
<sup>۴</sup>دانشیار، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، تهران، ایران

| چکیده   | واژگان کلیدی  |
|---|---|
| <p><b>هدف:</b> هدف از این مطالعه، ایجاد موتاسیون در ژن <i>PDX-1</i> جوجه، از طریق ایجاد یک gRNA مکمل با قسمتی از ژن <i>PDX-1</i> است. هدف این رویکرد ایجاد جهش‌های هدفمند با کاربردهای درمانی بالقوه در ژن‌درمانی است. <b>مواد و روش‌ها:</b> جهت حذف و تغییرات در ژن <i>PDX-1</i> جوجه، توالی RNA راهنمای تکی (single guide RNA, sgRNA) از نرم افزار اینترنتی CRISPR Design Tool طراحی شد. و از طریق آنزیم‌های برشی و واکنش الحاق در وکتور لنتی ویروسی LentiCRISPRv2GFP کلون شد و از طریق شوک حرارتی در سلول‌های میزبان <i>Escherichia coli Top10</i> ترانسفورم شد. <b>نتایج:</b> نتایج PCR یک قطعه تکثیر شده به طول ۲۶۷ جفت باز (bp) را نشان داد که نشان‌دهنده وجود ژن <i>sgPDX-1</i> بود. این قطعه روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. علاوه بر این، هضم معکوس با دو آنزیم محدودکننده، یک قطعه ۲۰۰۰ جفت بازی جدا شده از ناقل را تولید کرد. نتایج تعیین توالی، موفقیت‌آمیز بودن فرآیند کلونینگ را تایید کرد. <b>نتیجه‌گیری:</b> ژن <i>PDX-1</i> مرغ در یک وکتور لنتی ویروسی حاوی ساختار CRISPR/Cas9 کلون شد. وکتور نو ترکیب LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1 با موفقیت به دست آمد. ساختار ژنی توسعه یافته در این مطالعه پتانسیل قابل توجهی برای بررسی عملکرد ژن و استفاده در ژن‌درمانی دارد. در نتیجه، استفاده از این ساختار ممکن است امکان ایجاد یک مدل حیوانی در جنین‌های مرغ با نقص، از جمله حفره خالی اندام یا بافت، را فراهم کند. چنین مدلی امکان بررسی و درمان نقص‌ها را با استفاده از داروها و رده‌های سلولی خاص فراهم می‌کند.</p> | <p>سیستم کریسپر-کس،<br/>         ویرایش ژن، لنتی<br/>         ویروس، RNA راهنما</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۱<br/>         تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۵<br/>         تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۶</p> |

### ۱- مقدمه

یکی از فن‌آوری‌های ویرایش ژنوم که می‌تواند باعث ایجاد تغییرات به خصوص از نوع حذف در ژنوم شود، سیستم پروتئینی مرتبط با تناوب‌های کوتاه پالیندرومی فاصله دار منظم خوشه ای (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas9) می‌باشد.

این فناوری متشکل از اجزای ژنومیکی (CRISPR) و پروتئومیکی (Cas) می‌باشد که در ابتدا در ارتباط با سیستم ایمنی القایی در تقریباً ۷۵ درصد از باکتری‌ها و آرکی‌ها در پاسخ به حمله فاژها و انتقال پلازمید در طبیعت شناسایی شد. باکتری‌ها با این سیستم قادر به شناسایی ویروس جدید و حذف آن شدند (۱، ۲). قسمت ژنومی شامل توالی‌های کوتاه پالیندرمی منظم تکراری بوده که در میان آن‌ها توالی‌های کوتاه متغیری به نام فاصله انداز یا spacer وجود دارد. طول توالی تکرارشونده از ۲۵ تا ۴۰ نوکلئوتید متغیر است. در حالی که طول توالی فاصله انداز از ۲۱ تا ۷۱ نوکلئوتید متغیر می‌باشد (۱). در طی فرآیند ایمن سازی، قطعات کوتاهی از DNA خارجی در قسمت فاصله انداز آرایه CRISPR در کروموزوم میزبان ادغام می‌شوند، در نتیجه یک سابقه ژنتیکی از عفونت قبلی ارائه می‌شود که میزبان را قادر می‌سازد از تهاجم آینده به همان مهاجم جلوگیری کند. با رونویسی و پردازش از منطقه فاصله انداز جدید، RNA های کوتاه بالغ به نام CRISPR RNA (crRNA)، ایجاد می‌شود که از قسمت 5' اش مکمل قطعه فاصله انداز خارجی است و از قسمت 3' مکمل با ناحیه منظم پالیندرمی تکراری است. هیبریداسیون بین فاصله انداز در crRNA و توالی مکمل از هدف خارجی در سیستم CRISPR، موجب تحریک فعالیت سیستم اندونوکلئازی Cas شده که منجر به شناسایی و تخریب قطعه DNA یا RNA خارجی در ورود دوم به همان یاخته می‌شود (۳). یک موتیف حاوی توالی حفاظت شده کوتاه (۲ تا ۵ جفت باز) به نام موتیف مجاور فاصله انداز اولیه (Protospacer adjacent motif (PAM))، که در مجاورت توالی هدف‌گیری شده با crRNA روی DNA مهاجم قرار دارد، نقش اساسی در انتخاب و تخریب DNA هدف در اکثر سیستم‌های Cas/CRISPR ایفا می‌کند. سیستم‌های CRISPR به ۶ تیپ مختلف تقسیم می‌شوند. در این میان، تیپ II، دارای یک اندونوکلئاز تکی ویژه DNA به نام Cas-9 می‌باشد که با دومین‌های نوکلئازی ویژه‌اش برای هر رشته از DNA، منجر به ایجاد شکست در دو رشته DNA می‌شود. همچنین یک قطعه RNA کوتاه اضافی، به نام قطعه فعال کننده ترانس crRNA یا tracer-RNA نیز در این سیستم حضور دارد که با ناحیه منظم تکراری در crRNA جفت می‌شود تا یک ساختار RNA هیبریدی دو گانه‌ای را تشکیل دهد. این RNA راهنمای دو گانه که RNA راهنما (gRNA) (grRNA) نامیده می‌شود، اندونوکلئاز Cas9 را هدایت می‌کند تا دو رشته DNA حاوی یک توالی هدف مکمل ۲۰ نوکلئوتیدی و PAM مجاور را برش دهد (۳ و ۴). بنابراین این فناوری، متشکل از یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی است که حاوی پروتئین Cas9 و یک RNA راهنمای تکی (sgRNA) می‌باشد که باعث ایجاد شکست‌هایی در دو رشته DNA می‌شود (۴). در طول فرآیند تعمیر از نوع مستعد خطا (error-prone) وابسته به دو رشته، با اتصال انتهای غیر همولوگ، منجر به ایجاد درج‌ها یا حذف‌های کوچک (Indel) در آن منطقه ژنوم می‌شوند و این تغییرات کوچک، می‌تواند منجر به جابجایی و تغییر در چارچوب خواندن و اختلال عملکردی نهایی پروتئین‌های هدف شود. از آنجایی که سیستم CRISPR/Cas9 تنها به یک جفت اولیگونوکلئوتید حاوی توالی هدف نیاز دارد، آماده سازی پلاسمید برای اختلال ژن هدف با کارایی گزارش شده بالای ۸۰ درصد، در مقایسه با سایر تکنیک‌های به کار رفته در مهندسی ژنتیک، بسیار آسان تر و مقرون به صرفه تر است (۵). این استراتژی به‌طور موفقیت آمیزی در هدف گذاری ژنی در کشت‌های سلولی و تولید ارگانیسم‌های موتانت شده کاربرد دارد (۴). سیستم CRISPR/Cas9 یک ابزار ساده و توانا در ویرایش ژنوم در موجودات مختلف از جمله دام (جوجه، بز و...)، خوک، و خرگوش می‌باشد (۶-۱۰). این سیستم از قدرت بالایی در راستای بررسی عملکرد ژن و کاربرد در ژن درمانی، برخوردار است (۶). در این راستا، این سیستم از مناسب ترین روش‌ها در مطالعات تکوینی در جنین جوجه نیز می‌باشد (۱۱).

فاکتور رونویسی هومئودومین (Homeodomain transcription factors) یا *PDX-1* دارای یک نقش مهم اصلی در بقای سلول‌های  $\beta$  پانکراس می‌باشد. به‌عنوان یک فاکتور رونویسی کلیدی در تنظیم بیان ژن انسولین موثر بوده و همچنین نقش این فاکتور در تکوین و رشد طبیعی پانکراس از طریق تعیین بلوغ و تمایز سلول‌های پیش ساز پانکراس ضروری

است. اهمیت *PDX-1* در لوزالمعده با ایجاد آژنزیس پانکراس در موش‌های پوچ *PDX-1* مشخص می‌شود. بنابراین، *PDX-1* برای رشد مناسب پانکراس و نیز عملکرد سلول‌های بتا مورد نیاز است (۱۲).

در دهه گذشته، در میان حاملین ژنی مختلف، استفاده از وکتورهای مبتنی بر لنتی ویروس‌ها، با هدف کاربردهای بالینی، در انتقال پایدار ژن‌ها به سلول‌های بنیادی سوماتیک و سلول‌های T افزایش داشته است. وکتورهای لنتی ویروسی، دارای ظرفیت بارگیری ژنی نسبتاً بالا، کاهش احتمال خاموش شدن بیان ژن پس از ورود به ژنوم، کارایی بالا در ارثه ژن‌ها به سلول‌های مختلف هدف، افزایش بالای میزان بیان ژن، عدم ایجاد واکنش‌های ایمنی ناخواسته و داشتن طیف وسیع انتخابی در پروتئین‌های انولوپ جایگزین می‌باشند. این عوامل استفاده تقریباً انحصاری از وکتورهای لنتی ویروسی را در دهه گذشته برای انتقال پایدار ژن‌ها به سلول‌های بنیادی سوماتیک و سلول‌های T با هدف کاربردهای بالینی توجیه می‌کند (۱۳-۱۵). در این مطالعه، ژن *PDX-1* جوجه، جهت ایجاد موتاسیون‌های هدفمند با کاربردهای درمانی و ژن درمانی، در وکتور لنتی ویروسی حاوی سازه CRISPR/Cas9 کلون شده که با هدف تولید مدل حیوانی در جنین جوجه دارای نقص و کنام خالی اندام یا بافت مورد نظر می‌باشد، تا از طریق دارو و رده سلولی خاص بتوان این نقص را بررسی و درمان کرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**وکتور *LentiCRISPRv2GFP*** جهت کلون نمودن ژن *PDX-1* از وکتوری به نام *LentiCRISPRv2GFP* به صورت هدیه ای از دیوید فلدسر (Addgene، آمریکا) استفاده شد.

**طراحی و کلون کردن *RNA راهنما* یا (*sgRNA*) *Single guide RNA***: در این مطالعه که از نوع بنیادی- کاربردی می‌باشد، جهت کلون نمودن ژن *PDX-1* در وکتور *LentiCRISPRv2GFP*، ژن *PDX-1* (XM\_040658386.2) از سایت NCBI به آدرس [ncbi.nlm.gov](http://ncbi.nlm.gov) دریافت شد. ژن *PDX-1* بر روی کروموزوم شماره یک در جوجه قرار دارد. این ژن حاوی دو اگزون شماره یک و دو می‌باشد. جهت حذف و تغییرات در این ژن، توالی *RNA راهنمای* تکی یا *sgRNA* طراحی می‌شود. که این توالی در حدود ۱۰۰ bp طول دارد. حدود ۷۶bp از این توالی به بخش داریست تعلق دارد که در وکتور مربوطه (*LentiCRISPRv2GFP*) در محدوده ۷۳۵۷-۷۲۸۲ bp روی وکتور، از پیش تعبیه شده است. ناحیه‌ای که مسئول اتصال *sgRNA* به توالی ژنومی هدف است، ۲۰bp طول دارد که مکمل ۲۰ نوکلئوتید از اگزون شماره یک از ژن *PDX-1* است که شامل توالی رهبر و توالی پیرو به شرح ذیل می‌باشد.

5'-CACCGTTGACAGCTCGCCGCTCCGT-3'

5'-AAACACGGAGCGGCGAGCTGTCAAC-3'

برای طراحی توالی *sgRNA* ویژه لوکوس *PDX1* (*sgPDX1*) از نرم‌افزار اینترنتی *CRISPR Design Tool* (<http://crispr.mit.edu>) استفاده شد (۱۶). برای اتصال دو الیگونوکلئوتید و تولید قطعه دو رشته‌ای و کلون کردن این قطعه در وکتور *LentiCRISPRv2GFP* به طریق زیر عمل خواهد شد.

۱. برای اتصال دو الیگونوکلئوتید به یکدیگر و تشکیل یک قطعه کوتاه دورشته‌ای مخلوط تهیه شد. مخلوط حاوی دو رشته سنس و آنتی سنس از الیگونوکلئوتیدهای مورد نظر از اگزون یک ژن *PDX-1* به همراه آنزیم T4 لیگاز (برند سیناکلون، ایران)، در حجم مشخصی از واکنش می‌باشد.

۲. مخلوط فوق با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ( برند bio rad مدل T100، آمریکا)، ابتدا برای ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری خواهد شد و سپس دما تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد با شیب دمایی ۶ درجه سانتی‌گراد در دقیقه کاهش داده شد. که منجر به اتصال دو قطعه به یکدیگر می‌شود.

**واکنش هضم آنزیمی قطعه الیگونوکلئوتیدی و وکتور:** وکتور *LentiCRISPRv2GFP*، پس از تکثیر و تخلیص از باکتری *شریشیپاکی* در واکنش هم‌زمان هضم و اتصال به‌کار گرفته شد. قطعه الیگونوکلئوتیدی دو رشته‌ای تولید شده و وکتور *LentiCRISPRv2GFP* تحت هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Bsmbl* (برند کیاژن، ژاپن)، با توالی برشی CGTCTCN (7353-7373bp) قرار داده شد. آنزیم *Bsmbl* پایین دست محل تشخیص خود را می‌شکافد و می‌تواند بازهای ۴ نوکلئوتیدی آویزان از هر قسمت 5' دلخواه را ایجاد کند.

**الحاق قطعات برشی از *sg PDX-1 (sgRNA)* به وکتور *LentiCRISPRv2GFP*:** جهت اتصال توالی *sg PDX-1* برش خورده با آنزیم *Bsmbl* و وکتور برش خورده با همان آنزیم، مخلوط وکتور و قطعه نوکلئوتیدی برش خورده در واکنش الحاق با آنزیم T4 لیگاز قرار گرفت. تا وکتور *LentiCRISPRv2GFP-sgPDX-1* به‌دست آید که یک رونوشت از *sgRNA* یا *sgPDX-1* را ایجاد کرده، که می‌تواند یک توالی منحصر به فرد واقع در اگزون ۱ ژن *PDX-1* جنین جوجه را هدف قرار دهد. واکنش الحاق بعد از تعیین غلظت وکتور و قطعه الحاقی، به‌وسیله آنزیم T4 لیگاز و طی واکنشی انجام شد. این مخلوط حاصل از وکتور و آنزیم به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰-۱۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این دما کمک می‌کند تا تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین دو انتهای چسبنده آسان‌تر و با پایداری بیشتری انجام شود. زمان طولانی واکنش این امکان را می‌دهد که آنزیم لیگاز زمان کافی برای تشکیل پیوند فسفودی استری را داشته باشد.

**ترانسفورم وکتور کلون شده *LentiCRISPRv2GFP-sgPDX-1* به میزبان باکتریایی:** جهت تراریخت نمودن سلول‌های میزبان *Escherichia coli Top10* با وکتور کلون شده *LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1*، از روش شوک گرمایی استفاده شد. این فرایند به ترتیب زیر صورت گرفت:

۱. ابتدا ویال سلول‌های مستعد از دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و روی یخ قرار داده شد، تا به آرامی ذوب شوند.
۲. حداکثر ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش الحاقی در شرایط استریل به ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های مستعد اضافه و پس از مخلوط کردن، به‌مدت ۳۰ دقیقه ویال‌ها بر روی یخ نگهداری شد.
۳. جهت اعمال شوک حرارتی، ویال‌ها از یخ خارج شده و در بن ماری (برند BSH25D، آلمان)، با دمای ۴۲ میکرولیتر به‌مدت ۹۰ ثانیه قرار دادند.
۴. بلافاصله ویال‌ها به‌مدت ۳ دقیقه در ظرف حاوی یخ قرار داده شد.

۵. به ویال مورد نظر در شرایط استریل ۱ میلی‌لیتر از محیط *Luria-Bertani (LB)*، مایع (از برند سیگما آلدریج، آمریکا)، بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این مدت سلول‌ها ضمن ترمیم آسیب‌های ناشی از تیمار  $CaCl_2$  و تکانه حرارتی، پروتئین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را که توسط پلاسمید کد می‌شود بیان می‌کنند.
۶. ویال‌ها به‌مدت ۳ دقیقه با سرعت  $2000 \times g$  سانتریفوژ (از برند ترموفیشر، آمریکا)، خواهند شد و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب در ۵۰ میکرولیتر محیط *LB* مایع دوباره حل شد و بر روی محیط *LB* آگاردار (جامد) حاوی آنتی‌بیوتیک مربوطه (آمپی‌سیلین به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برند سیگما آلدریج، آمریکا)، کشت داده و به‌مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌هایی که حاوی پلاسمید باشند می‌توانند روی محیط رشد کنند اما آن‌هایی که فاقد DNA

هستند قادر به رشد در محیط آنتی‌بیوتیک‌دار نیستند و با این غربالگری می‌توان سلول‌های حاوی DNA نو ترکیب را از دیگر سلول‌ها تفکیک کرد.

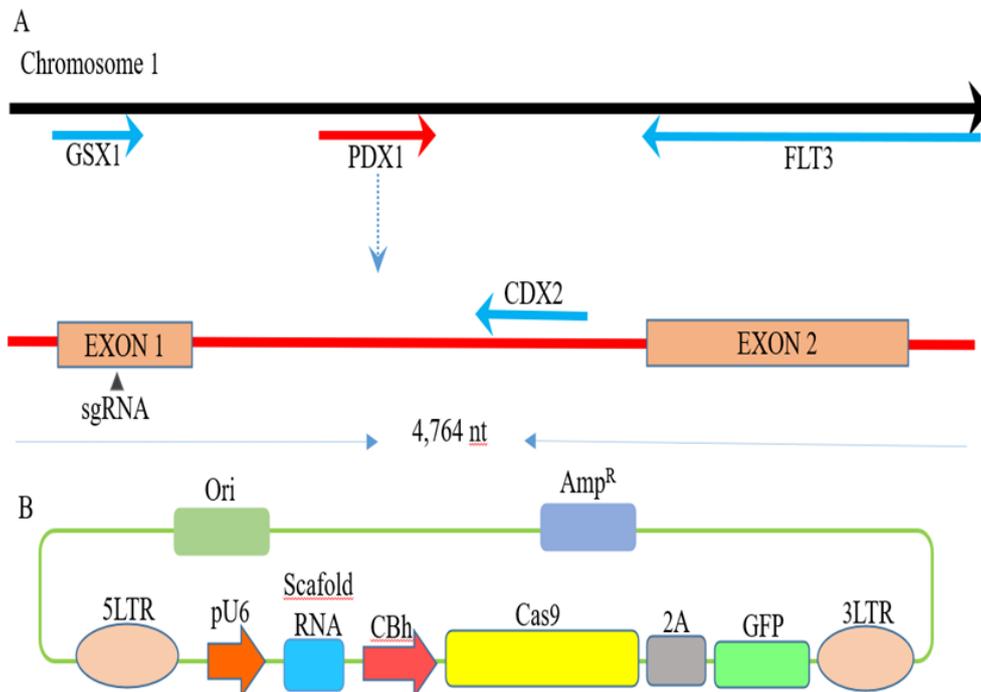
**تایید کلون‌های به‌دست آمده:** الف- روش کلونی PCR: جهت تایید حضور ژن *sgPDX-1* در وکتور LentiCRISPRv2GFP، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده مربوط به بخشی از توالی پروموتور U6 (forward)، بالادست ناحیه *sgRNA* و قسمتی از پایین دست ناحیه ژن *sgRNA* (Reverse)، واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد. در ژل آگارز، قطعه تکثیر شده با اندازه ۲۶۷ bp ردیابی شد.

ب- روش هضم آنزیمی: هریک از کلونی‌های به‌دست آمده که در روش کلونی PCR، با استفاده از دو آنزیم برشی *EcoRV* و *Bsmbl* (برند کیاژن، ژاپن) در واکنش هضم آنزیمی قرار گرفتند. انتظار می‌رود قطعه ای با اندازه ۲۰۰۰ bp از وکتور جدا شود.

ج- توالی یابی: جهت تایید نهایی کلون شدن ژن *sgPDX-1*، هریک از باندهای به‌دست آمده در روش کلونی PCR، برای توالی یابی (شرکت پیشگام، ایران) ارسال شد.

### ۳- نتایج

وکتور LentiCRISPRv2GFP، ۱۳۱۲۹ bp طول دارد و حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین می‌باشد. در حدود (۱۵۸/۴ KDa) ۴۱۰۴ bp روی وکتور، متعلق به توالی Cas-9 می‌باشد که پایین دست پروموتور EF-1-alpha core قرار دارد. همچنین، حدود ۷۶bp از توالی مربوط به *gRNA* نیز بر روی این وکتور (۷۲۸۲ bp - ۷۲۵۷ bp) و در پایین دست پروموتور hU6 قرار دارد. توالی مربوط به ژن گزارشگر GFP (۷۱۷pb) نیز پایین دست توالی Cas-9 قرار دارد (شکل ۱).



شکل ۱: نمایش شماتیک از A: کروموزوم شماره یک در جوجه. و دو اگزون موجود در ژن *PDX-1* که طراحی *sgRNA* منطبق بر اگزون شماره یک می‌باشد. B: نقشه شماتیکی از وکتور LentiCRISPRv2GFP.

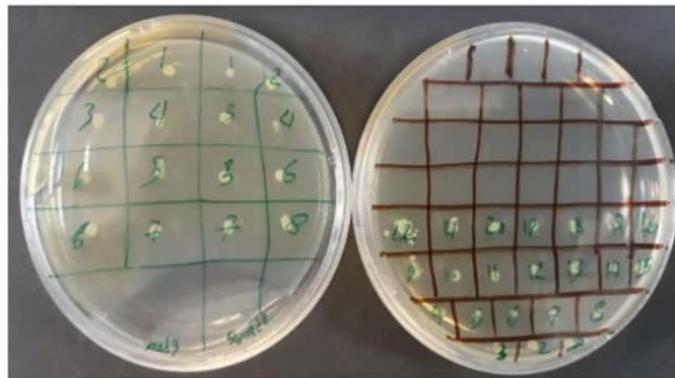
ژن *PDX-1* از کروموزوم یک جوجه، با اندازه ۴۷۵۴ bp و دارای دو ناحیه اگزون یک و دو می‌باشد که قطعه الیگونوکلئوتیدی sgRNA منطبق بر این قسمت می‌باشد.

### نتایج هضم آنزیمی و واکنش الحاق

با روش هضم آنزیمی با آنزیم *Bsmbl* قطعه‌ای با دو انتهای چسبنده هم در وکتور و هم در قطعه الیگونوکلئوتیدی از ناحیه اگزون یک از ژن *PDX-1* به دست آمد که در واکنش الحاق به یکدیگر متصل شدند.

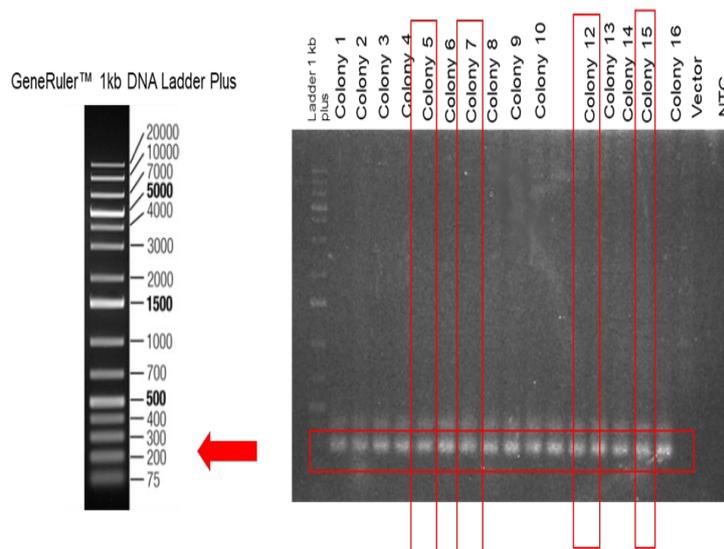
### نتایج واکنش ترانسفورم و تایید کلون

پس از واکنش ترانسفورم، کلونی‌های حاوی وکتور کلون شده (*LentiCRISPRv2GFP-sgPDX-1*) (شکل ۲)، به دست آمد.



شکل ۲: کلونی‌های حاصل از کشت بعد از واکنش ترانسفورم

حضور وکتور *LentiCRISPRv2GFP-sgPDX-1* در هر یک از کلونی‌ها با استفاده از روش کلونی PCR (شکل ۳) و هضم آنزیمی (شکل ۴) تایید شد. همچنین هر یک از کلون‌های به دست آمده، از طریق توالی‌یابی مورد تایید نهایی قرار گرفت (شکل ۵).



شکل ۳: کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از پروموتور U6 (فوروارد) و پایین دست ژن *sgPDX-1* (ریورس). قطعه‌ای با اندازه ۴۷۵۴ bp مورد انتظار، به دست آمد.



## ۴- بحث

رشد سریع تکنولوژی اصلاح ژنوم، تحقیقات بر روی عملکرد ژن‌های خاص و تولید مدل‌های حیوانی را آسان کرده است. در حیوانات اهلی این تکنولوژی می‌تواند ارزش زیادی هم در بخش تحقیقات و هم در بخش اقتصادی داشته باشد. برای مثال می‌توان به افزایش تولید حیوانات و یا تولید حیوانات مقاوم به بیماری اشاره داشت. در گونه‌های پرندگان نیز کاربرد تکنولوژی اصلاح ژنوم به دلیل قابلیت بالای آن‌ها از لحاظ تولیدات اقتصادی و همچنین ایجاد مدل‌هایی برای تحقیقات بیولوژیکی تاکید فراوان شده است (۱۷).

روش‌هایی که برای ایجاد پرندگان تراریخت استفاده می‌شوند بیشتر به منظور انتقال ژن‌های خارجی درون سلول‌های هدف می‌باشند. تاکنون روش‌های مختلفی برای ایجاد پرندگان تراریخت پیشنهاد شده است. با این وجود به دلیل تفاوت‌های ساختاری و فیزیولوژیکی که میان پرندگان و پستانداران وجود دارد، راندمان تولید پرندگان تراریخت که توانایی انتقال ویژگی‌های ژن هدف به نسل بعد را داشته باشند، متغیر بوده است. از روش‌های متعددی شامل تزریق به داخل پیش هسته (Pronuclear Microinjection) انتقال از طریق هسته سلول‌های بدنی (Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)، انتقال از طریق ویروس‌ها (Viral Infection)، انتقال از طریق سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cell (ESCGT) Transfer Gene، انتقال از طریق بیضه (Testis Mediated Gene Transfer (TMGT)، انتقال از طریق اسپرم (Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT)، انتقال از طریق سلول‌های بلاستودرم جنینی، انتقال از طریق سلول‌های زاینده اولیه (Primordial Germ Cell (PGC)، سلول‌های بنیادی اسپرم (Spermatogonial Stem Cells (SSC)، و انتقال ژن به واسطه ترنسپوزون یا تکنیک‌هایی که برای هدف‌گیری ژن و اصلاح ژنوم هستند که همانند مگانوکلنازها، نوکلنازهای انگشت روی (Zinc finger nuclease (ZFN)، نوکلنازهای افکتوری شبه فعال کننده رونویسی (TALEN) Tale transcription، و activator-like effector nuclease و CRISPR/Cas9 برای دست‌ورزی ژنتیکی طیور استفاده شده است (۱۸، ۱۹). ویژگی کاربردی مدل جوجه، بر اساس زمان تولید مثل کوتاه و جمعیت بالای افراد نسل شان است که دستیابی به نتایج مطلوب را تسهیل می‌کند. شباهت الگوی گلیکوزیلاسیون پروتئین به انسان، پیچیدگی بیوشیمیایی کم پروتئین‌های بومی تخم مرغ و تولید داروی زیستی مقرون به صرفه یکی از مزایای استفاده از مدل جوجه است. در پرندگان، تغییرات ژنی با استفاده از سیستم CRISPR در مطالعاتی محدود به هدف‌گیری سلول‌های سوماتیکی پرندگان و بافت‌ها گزارش شده است. اصلاحات ژنتیکی خاص ژنوم جوجه را می‌توان با هدف قرار دادن سلول‌های زایای اولیه (PGCs) و تولید جوجه‌های ویرایش شده ژنتیکی ایجاد نمود (۱۱).

فاکتور رونویسی *PDX-1* توسط ژن هومئودومین شبه *Hox* کد می‌شود که نقش مهمی در رشد پانکراس، تمایز سلول‌های  $\beta$  و حفظ عملکرد سلول‌های  $\beta$  بالغ دارد. تحقیقات در مورد رابطه بین *PDX-1* و دیابت به دلیل افزایش شیوع دیابت شیرین یا دیابت ملیتوس، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. مطالعات اخیر نشان داده اند که بیان بیش از حد *PDX-1* رشد پانکراس را تنظیم می‌کند و باعث تمایز سلول‌های  $\beta$  و ترشح انسولین می‌شود. همچنین نقش حیاتی در بازسازی سلولی، ویرایش ژن و توسعه دارو ایفا می‌کند. برعکس، عدم وجود *PDX-1* حساسیت به دیابت ملیتوس را افزایش می‌دهد (۲۰). در پژوهش حاضر، ابتدا با استفاده از نرم افزار اینترنتی CRISPR Design Tool، قطعه ۲۰ grNA، قطعه *Bmsb1* ژن *PDX-1* جوجه، طراحی و آماده شد. قطعه الیگونوکلئوتندی از sgrNA راهنما و ناحیه ورودی وکتور با آنزیم *Bmsb1* برش‌گر و آنزیم DNA لیگاز ناقل نو ترکیب ساخته شد. وکتور لنتی ویروسی *LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1* حاوی

ناقل نوترکیب با روش شوک حرارتی به میزبان باکتریایی ترانسفورم شد. با استفاده از روش کلونی PCR و توالی یابی قطعه ۲۶۷bp تکثیر شده و هضم آنزیمی از منطقه ۲۰۰۰ bp حاوی قطعه gRNA، کلون به دست آمده مورد تایید قرار گرفت.

در این مطالعه برای اولین بار، یک سازه نوترکیب حاوی ژن *PDX-1* جوجه، با استفاده از وکتور لنتی ویروسی حاوی سازه CRISPR/Cas9 طراحی و تولید شد تا در آینده بتوانیم با انتقال مستقیم این سازه نوترکیب به جنین و سلول جوجه، بستری کاربردی برای تحقیقات فراهم آوریم. تاکنون مطالعات زیادی بر روی اثر و نقش ژن *PDX-1* با هدف ژن درمانی به کمک سازه CRISPR/Cas9 در موجودات مختلف انجام شده است (۲۱-۲۳). در مطالعه ای توسط Liu و همکاران (۲۴)، با حذف ژن بیان کننده پروتئین تیروزین فسفاتاز-۱ حاوی دومین ۲ سارکوم یا *SHP-1* از سلول‌های  $T CD8^+$  به روش CRISPR، فعالیت ضد توموری در برابر کارسینوم هیپاتوسلولار در مدل انسانی کارسینوما هیپاتوسلولار با *PDX* را افزایش دادند به گونه‌ای که توانستند با ترکیب این سلول‌های اصلاح شده با داروی سیمواستاتین به طور هم‌افزا اثر درمانی را تقویت کرده و مقاومت به ایمنی درمانی را کاهش دادند. همچنین در مطالعه ای توسط Hu و همکاران (۲۵)، که به توسعه یک پلتفرم فعال سازی رونویسی مبتنی بر CRISPR-dCas-9 (نسخه غیر برش دهنده Cas-9) پرداخته اند، توانستند فعال سازی ژن‌ها را به طور دقیق در زمان و مکان به خصوص در مدل‌های موشی دیابتی (از طریق فعال سازی ژن *PDX-1* و توموری کنترل کنند. بنابراین این پلتفرم، یک ابزار قدرتمند برای تصویر سازی (microRNA (miRNA) و ژن درمانی با کنترل دقیق زمانی و مکانی است، که قابلیت انتقال بالینی داشته و می تواند در درمان سرطان و دیابت در آینده کاربردی شود.

سیستم CRISPR/Cas9 می تواند ابزار مفیدی برای اصلاح ژنوم از طریق حذف و تغییر عملکرد ژن باشد. و ثابت شده است که روشی آسان تر و سودمندتر در مقایسه با سایر تکنیک‌های ویرایش ژنتیکی، مانند ZFN و TALEN هم در مدل‌های حیوانی و هم در پزشکی انسانی و دامپزشکی است (۲۴). مزایای بسیاری در استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 نسبت به دو روش گفته شده وجود دارد. از جمله این‌که، سیستم CRISPR توانایی ایجاد جهش در توالی‌های متیله و غیر متیله را دارد و برای ایجاد جهش تنها به حداقل ۲۰ نوکلئوتید نیاز دارد. در حالی که روش‌های مبتنی بر جهش مانند ZFN و TALEN، فاقد توانایی در برش جایگاه متیله بوده و با صرف هزینه، زمان و پیچیدگی‌های زیادتری باید بر روی تغییر توالی‌های اسید آمینه ای متمرکز باشند (۲۵، ۲۶). همچنین جهش‌های مورد نظر را می توان با سرعت از طریق توالی یابی سنتی سنگر و بدون انتخاب نشانگر ردیابی و بررسی کرد. به علاوه، چندین gRNA را می توان در یک آرایه CRISPR وارد نموده تا چندین لوکوس و حتی چندین منطقه را در یک لوکوس ژنی مورد هدف قرار دهد و کتابخانه‌های gRNA بزرگی را نیز می توان برای ایجاد ناک اوت‌هایی در مقیاس ژنوم در ارگانیسم میزبان تولید کرد (۲۷). هر چند کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژن و اصلاح ژنوم در گونه‌های پرندگان هنوز در حال پیشرفت است، اما در چندین مطالعه، جهش موفق درج- حذف Insertion-deletion (indel) با واسطه CRISPR/Cas9 در رده‌های سلولی پرندگان نشان داده شده است. در مطالعه‌ای توسط Jinsoo Ahn و همکاران (۲۹)، با استفاده از وکتور مبتنی بر آرایه CRISPR چندین جهش ایندل در لوکوس ملانوفیلین بلدرچین با کارایی بالا در تغییر ژن ایجاد شد. در مطالعه دیگری توسط Qisheng Zuo و همکاران (۳۰)، با استفاده از سازه CRISPR/Cas9 با کارایی ۴۰ درصد و هدف گذاری ژن *CIEIS* به نقش آن در تمایز سلول‌های بنیادی جوجه (ESCs) به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) پی بردند. به طوری که با ایجاد موتاسیون در این ژن، این تمایز مهار می‌شود. در مطالعه دیگری توسط Yan Zhang و همکاران (۳۱) که با هدف بررسی عملکرد ژن *Strad* در فرآیند تمایز ESCs جوجه به SSCs بود، نتایج نشان داد که Cas9/gRNA نه تنها منجر به حذف ژن *Strad* می‌شود، بلکه نشان می‌دهد که تولید SSCs توسط ناک‌داون

ژن *Stra8* در شرایط آزمایشگاهی مسدود می‌شود. بنابراین نشان دادند که سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند واسطه ژن *Stra8* پایدار در سلول‌های جوجه باشد و تمایز ECSs به SSCs را مهار کند.

## ۵- نتیجه‌گیری

با توجه به مزایای ذکر شده از کاربرد سازه CRISPR و وکتورهای لنتی ویروسی در ویرایش ژنوم، جهت ایجاد موتاسیون‌های هدفمند با کاربردهای درمانی و ژن درمانی، ژن *PDX-1* جوجه، در وکتور لنتی ویروسی حاوی سازه CRISPR/CAS9 کلون شد و ناقل نو ترکیب LentiCRISPRv2GFP-sgPDX1 به دست آمد. سازه ژنی تولید شده در این مطالعه، از قدرت بالایی در راستای بررسی عملکرد ژن و کاربرد در ژن درمانی، برخوردار است. بدین ترتیب با استفاده از چنین سازه ای، می‌توان در جهت تولید مدل حیوانی در جنین جوجه دارای نقص و کنام خالی اندام یا بافت اقدام کرد تا از طریق دارو و رده سلولی خاص بتوان این نقص را بررسی و درمان نمود.

## ۶- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران محترم بخش مهندسی ژنتیک پژوهشگاه رویان تهران که در انجام این کار ما را همراهی نمودند و از این موسسه به جهت تامین بودجه این تحقیق قدردانی و تشکر می‌نماییم.

## ۸- منابع

1. Qu D, Lu S, Wang P, Jiang M, et al. Analysis of CRISPR/Cas system of *Proteus* and the factors affected the functional mechanism. *Life Sci.* 2019; 231:116531.
2. Chekani-Azar S, Gharib Mombeni E, Birhan M, Yousefi M. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its application to the coronavirus disease (COVID-19): a review. *J Life Sci Biomed.* 2020;10(1):1-9.
3. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017; 46:505-29.
4. Briner AE, Barrangou R. Guide RNAs: a glimpse at the sequences that drive CRISPR-Cas systems. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(7):pdb. top090902.
5. Basiri M, Behmanesh M, Tahamtani Y, Khalooghi K, et al. The convenience of single homology arm donor DNA and CRISPR/Cas9-nickase for targeted insertion of long DNA fragment. *Cell J.* 2016;18(4):532-9.
6. Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, et al. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2016; 6:23980.
7. Li Q, Qin Z, Wang Q, Xu T, et al. Applications of genome editing technology in animal disease modeling and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019; 17:689-98.
8. Xu X, Gao D, Wang P, Chen J, et al. Efficient homology-directed gene editing by CRISPR/Cas9 in human stem and primary cells using tube electroporation. *Sci Rep.* 2018; 8:11649.
9. Proudfoot C, Lillico S, Tait-Burkard C. Genome editing for disease resistance in pigs and chickens. *Anim Front.* 2019;9(3):6-12.

10. Kalds P, Zhou S, Cai B, Liu J, et al. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Front Genet.* 2019; 10:750.
11. Brackett B, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(2):353-7.
12. Chojnacka-Puchta L, Sawicka D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. *J Appl Genet.* 2020;61(2):221-9.
13. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 1994;371(6498):606-9.
14. Poletti V, Mavilio F. Designing lentiviral vectors for gene therapy of genetic diseases. *Viruses.* 2021;13(8):1526.
15. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272(5259):263-7.
16. Balaggan K, Ali R. Ocular gene delivery using lentiviral vectors. *Gene Ther.* 2012;19(2):145-53.
17. Chojnacka-Puchta L, Kasperczyk K, Plucienniczak G, Sawicka D, et al. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(1):31-5.
18. Brackett B, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(2):353-7.
19. Park TS, Kang KS, Han JY. Current genomic editing approaches in avian transgenesis. *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 190:144-8.
20. Zhang Y, Fang X, Wei J, Miao R, et al. PDX-1: a promising therapeutic target to reverse diabetes. *Biomolecules.* 2022;12(12):1785.
21. Krishnamurthy M, Kechele DO, Broda T, Zhang X, et al. Using human induced pluripotent stem cell-derived organoids to identify new pathologies in patients with PDX1 mutations. *Gastroenterology.* 2022;163(4):1053-63. e7.
22. Bheeman C, Vann K, Astapova O. The role of PDX1 in beta cell response to GLP1. *J Endocr Soc.* 2024;8(Suppl 1): bvae163.971.
23. Zhang WH, Zhuang JH, Guo YY, Chen XY, et al. Pancreatic agenesis and altered m6A methylation in the pancreas of PDX1-mutant cynomolgus macaques. *Zool Res.* 2024;45(6):1188-200.
24. Liu H, Wang G, Yu X, Luo J, et al. CRISPR/Cas9-mediated SHP-1-knockout T cells combined with simvastatin enhances anti-tumor activity in humanized-PDX HCC model. *i Science.* 2025;28(4):108745.
25. Hu C, Sun X, Guo B, Wang F. Toehold-based CRISPR-dCas9 transcriptional activation platform for spatiotemporally controllable gene therapy in tumor and diabetic mouse models. *ACS Nano.* 2025;19(12):45678-90.
26. Mançaneres ACF, Cabezas J, Manríquez J, de Oliveira VC, et al. Edition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 by CRISPR/Cas9 technology in equine adipose mesenchymal stem cells. *Animals.* 2020;10(6):1078.
27. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397-405.
28. Wang S, Peng Z, Wang S, Yang L, et al. KRAB-type zinc-finger proteins PITA and PISA specifically regulate p53-dependent glycolysis and mitochondrial respiration. *Cell Res.* 2018;28(5):572-92.

29. Ahn J, Lee J, Park JY, Oh KB, et al. Targeted genome editing in a quail cell line using a customized CRISPR/Cas9 system. *Poult Sci.* 2017;96(5):1445-50.
30. Zuo Q, Jin K, Wang Y, Song J, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of *C1EIS* inhibits chicken embryonic stem cell differentiation into male germ cells (*Gallus gallus*). *J Cell Biochem.* 2017;118(8):2380-6.
31. Zhang Y, Wang Y, Zuo Q, Li D, et al. CRISPR/Cas9 mediated chicken *Stra8* gene knockout and inhibition of male germ cell differentiation. *PLoS One.* 2017;12(2): e0172207.