Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Production and Transduction of a Recombinant Lentiviral Particle Carrying the PDX1 Gene in Chick Embryo Cell Culture

Akhlaghpour A[a,b]*, Hassani SN[b]

[a]Department of Stem Cells and Cancer, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
[b]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, Hassani SN. Production and Transduction of a Recombinant Lentiviral Particle Carrying the PDX1 Gene in Chick Embryo Cell Culture. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(1):1-16.

https://doi.org/10.61882/JCT /17..1. 17

KEYWORDS

Chick Embryo Cells
Gene Transfer
Lentivirus
PDX1 Gene
Viral Vectors

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Gene therapy involves transferring genetic material into target cells to correct mutations or introduce new biological functions. Among delivery systems, lentiviral vectors are considered efficient and reliable tools due to their ability to integrate stably into the host genome and transduce both dividing and non-dividing cells. This property provides long-term gene expression, which is highly valuable for therapeutic and experimental applications. The *PDX1* (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) gene plays a central role in pancreatic organogenesis and the regulation of insulin-producing beta cells. It acts as a transcription factor controlling genes critical for endocrine differentiation and insulin secretion. Chick embryos are a useful experimental model due to their accessibility, rapid development, and the responsiveness of their fibroblast and germ cells to gene transfer systems. These features make them suitable for studying gene delivery efficiency and expression stability.

Aim: The aim of this study was to construct and produce recombinant lentiviral vectors carrying the *PDX1* gene in HEK293T-LentiX cells and evaluate their transfer efficiency in chick embryonic fibroblast and germ cells. This work was conducted to assess the potential of lentiviral systems for stable gene delivery in avian cells.

Materials and Methods: *HEK293T-LentiX* cells were selected as producer cells due to their high transfection efficiency and viral packaging capability. They were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin

* Corresponding author. Tel: 01144442137
E-mail address: a.akhlaghpour@ausmt.ac.ir
DOI: https://doi.org/10.61882/JCT /17.1. 17.
Received: 27 Sep. 2025; Received in revised form: 29 Nov. 2025; Accepted: 30 Nov. 2025
Original Article
© Author

under standard incubation conditions (37°C, 5% CO_2). Lentiviral particles were generated using a three-plasmid packaging system, including a transfer vector containing the *PDX1* gene and two helper plasmids. Transfection was carried out using the calcium phosphate method. After 48–72 hours, the viral-containing supernatant was collected, filtered, and concentrated. Viral titers were determined by evaluating GFP expression in target cells through fluorescence microscopy and flow cytometry. Chick embryonic fibroblast and primordial germ cells were isolated and infected with various viral concentrations in the presence of 8 µg/ml polybrene to enhance infection. After incubation, cells were examined for GFP signal as evidence of successful gene transfer.

Results: High-titer recombinant lentiviral particles were successfully produced in HEK293T cells. Fluorescence microscopy revealed strong GFP expression, confirming the presence of functional viral particles. Flow cytometry analysis provided quantitative confirmation of high viral titers. Following transduction, chick embryonic fibroblast and germ cells exhibited clear GFP expression, indicating efficient infection and gene transfer. The *PDX1* gene was successfully delivered and expressed within target cells. Although transduction efficiency varied slightly between cell types, the overall results demonstrated that the lentiviral system provided stable and effective gene delivery to chick embryo-derived cells.

Discussion: The study confirmed that lentiviral vectors carrying the *PDX1* gene could be efficiently produced and used to achieve stable gene transfer in chick embryonic cells. This system's ability to integrate permanently into the host genome ensures consistent gene expression over time without repeated transfection. For functional genes like *PDX1*, this stability is crucial for maintaining insulin-related pathways and pancreatic cell differentiation. Chick embryos serve as an advantageous model because their cells are easily accessible, grow rapidly, and respond well to viral vectors. Such characteristics make them ideal for investigating genetic regulation during early development. Evaluation of viral titers using fluorescence microscopy and flow cytometry provided reliable data confirming efficient vector production. The integration of new tools such as CRISPR/Cas9 can further enhance lentiviral design precision, allowing targeted modification of specific genes. Combining these technologies may open promising avenues for studying metabolic disorders and for gene-based therapies.

Conclusion: Recombinant lentiviral vectors carrying the *PDX1* gene were successfully generated and used to transduce chick embryonic fibroblast and germ cells. The system exhibited high production efficiency, stable gene expression, and suitability for in vitro studies. These findings demonstrate that lentiviral vectors represent a powerful and versatile platform for gene transfer and experimental modeling in avian systems. Moreover, coupling lentiviral vectors with genome editing technologies could expand future applications in regenerative medicine and genetic engineering.

سلول و بافت، دوره ۱۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۵، صفحات ۱۷ تا ۳۲

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

تولید و انتقال ذرات لنتی‌ویروسی نوترکیب حامل ژن *PDX1* به سلول‌های جنین جوجه

عظیمه اخلاق پور[۱و۲*]، سیده نفیسه حسنی[۲]

[۱] گروه سلول‌های بنیادی و سرطان، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

[۲] گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی رویان، تهران، ایران.

واژگان کلیدی

جنین جوجه
ژن *PDX1*
لنتی‌ویروس
وکتورهای ویروسی
انتقال ژن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹

چکیده

هدف: هدف این پژوهش، تولید ذرات لنتی‌ویروسی نوترکیب حامل ژن *PDX1* در سلول‌های HEK293T-LentiX و ارزیابی کارایی انتقال آن‌ها به سلول‌های جنینی جوجه بود. **مواد و روش‌ها:** برای تولید ویروس، سلول‌های HEK293T-LentiX با سامانه سه‌پلاسمیدی ترانسفکت شدند و بیان GFP با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. تیتر ویروس به‌صورت کمی با فلوسایتومتری در سلول‌های HT1080 اندازه‌گیری شد. ذرات لنتی‌ویروسی به سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه منتقل شدند و بیان سازه نوترکیب به‌کمک تصویربرداری فلورسانس ارزیابی شد. **نتایج:** ذرات لنتی ویروسی با تیتر بالایی در سلول‌های HEK293T تولید شدند و با استفاده از روش فلوسایتومتری میزان تیتر ویروس ارزیابی و تایید شد. این ویروس نوترکیب با قدرت بالایی به‌درون سلول‌های جنینی جوجه انتقال یافتند. این تیتر ویروسی در سلول‌های HT1080 با استفاده از فلوسایتومتری ارزیابی و تایید شد. وجود ویروس در سلول‌های فیبروبلاست و پانکراسی جنین جوجه مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** ناقل‌های لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* که با بهره‌گیری از سامانه CRISPR/Cas9 طراحی شده‌اند، توانایی مناسبی برای انتقال ژن به سلول‌های جنینی جوجه نشان دادند. این سامانه می‌تواند به‌عنوان ابزار کارآمدی برای انتقال ژن‌های هدف به سلول‌های زایای اولیه و توسعه مدل‌های حیوانی اصلاح‌شده ژنتیکی با کاربردهای پژوهشی و زیست‌فناورانه مورد استفاده قرار گیرد.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۱۱۴۴۴۴۲۱۳۷

آدرس پست الکترونیک: a.akhlaghpour@ausmt.ac.ir

۱- مقدمه

علم زیست‌فناوری به‌طور کلی به مجموعه‌ای از فناوری‌ها اطلاق می‌شود که از سامانه‌های زندهٔ گوناگون به‌منظور تولید پروتئین‌ها و داروهای نوترکیب، مطالعه ساز وکار ژن‌های عملکردی و بیماری‌های انسانی و غیره استفاده می‌کند. لذا پرندگان به‌دلیل وجود میزان بالای پروتئین در تخم‌مرغ، شباهت زیاد الگوی گلیکوزیله شدن پروتئین‌های موجود در تخم مرغ به پروتئین‌های انسانی و ثبات زیستی پروتئین خارجی و مهم‌تر از همه، فاصله نسل کوتاه و هزینه پایین، در مقایسه با گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و پستانداران تراریخت، به‌عنوان یک راکتور زیستی مناسب در زیست‌فناوری مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱-۴).

انتقال یک ژن به ژنوم اغلب سلول‌های یک موجود پرسلولی که قابل انتقال به نسل بعد باشد را انتقال ژن گویند. روش‌هایی که برای ایجاد پرندگان تراریخت استفاده می‌شوند، بیشتر به‌منظور انتقال ژن‌های خارجی درون سلول‌های هدف می‌باشند. توسعه تکنولوژی‌های پیشرفته مهندسی ژنتیک در دهه‌های اخیر، امکانات بی‌نظیری را برای ایجاد مدل‌های حیوانی با دقت و کارایی بالا فراهم آورده است (۵). در این میان، سیستم CRISPR/Cas 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas9)) به‌عنوان یکی از انقلابی‌ترین ابزارهای ویرایش ژن، قابلیت‌های منحصر به فردی در زمینه تغییرات دقیق ژنومی ارائه می‌دهد (۶, ۷). این سیستم با ارائه دقت بالا، سرعت مناسب و کاهش هزینه‌های تحقیقاتی، راه را برای ایجاد مدل‌های حیوانی پیچیده و کارآمد هموار کرده است (۸). لنتی ویروس‌ها، زیرخانواده‌ای از رتروویروس‌ها هستند که دارای قابلیت‌های منحصر به فردی می‌باشند که آن‌ها را به‌عنوان حامل‌های مطلوب برای انتقال ژن متمایز می‌کند. لنتی ویروس‌ها قابلیت منحصر به‌فرد نفوذ به سلول‌های در حال تقسیم و غیرفعال را دارند که آن‌ها را از سایر حامل‌های ویروسی متمایز می‌کند. این ویژگی امکان هدف قرار دادن طیف گسترده‌ای از بافت‌ها فراهم می‌کند (۹). حامل‌های لنتی ویروسی به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، جایگاه ویژه‌ای در انتقال ژن‌های نوترکیب به سلول‌های هدف کسب کرده‌اند (۱۰). این ویروس‌های مهندسی شده قابلیت نفوذ به طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله سلول‌های در حال تقسیم و غیرفعال را دارند. همچنین قابلیت حمل ترانسژن‌های حجیم و پیچیده را دارا هستند که این امر آن‌ها را برای انتقال سیستم‌های پیچیده مانند CRISPR/Cas 9 که نیاز به انتقال چندین جز دارند، مناسب می‌کند. این ظرفیت بالا امکان ادغام پروموترهای قوی، توالی‌های تنظیمی و ژن‌های گزارش‌گر را به‌همراه ژن اصلی فراهم می‌کند. لنتی ویروس‌ها قابلیت تغییر پایدار ژنوم سلول هدف و بیان پایدار و طولانی مدت ترانسژن را دارند. این حامل‌ها با وارد کردن مواد ژنتیکی خود به ژنوم سلول میزبان، امکان بیان پایدار و طولانی مدت ژن اضافه شده را فراهم می‌کنند (۱۱, ۱۲). حامل‌های لنتی ویروسی سمیت سلولی و ایمونوژنیسیتی پایینی نشان می‌دهند و تاثیر کم‌تری بر سلول‌های میزبان دارند. این ویژگی آن‌ها را برای کاربردهای درمانی مناسب‌تر می‌کند. یکی از مهم‌ترین مزایای لنتی ویروس‌ها، قابلیت ادغام پایدار در ژنوم میزبان است که منجر به بیان طولانی‌مدت ژن‌های انتقال یافته می‌شود (۱۰, ۱۳, ۱۴). ویروس‌های لنتی مهندسی شده با سیستم CRISPR/Cas 9 دارای مزایای متعددی هستند که عبارتند از: راندمان انتقال بالا به سلول‌های مختلف، قابلیت حمل کاست‌های ژنی پیچیده شامل کمپوننت‌های مختلف سیستم CRISPR/Cas9، ایمنی زایی کم در مقایسه با برخی حامل‌های ویروسی دیگر و امکان کنترل دقیق بیان ژن از طریق پروموترهای قابل تنظیم را دارند (۱۱, ۱۵, ۱۶).

سلول‌های زایای اولیه (Primordial germ cell) (PGC) جوجه به‌دلیل قدرت تکثیر بالا و قابلیت تمایز به انواع مختلف سلول‌ها، بستر مناسبی برای کاربردهای مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. استفاده از حامل‌های لنتی ویروسی برای انتقال ژن *PDX1* (Pancreatic and Duodenal Homeobox1) به این سلول‌ها مزایای قابل توجهی دارد. نخست، لنتی ویروس‌ها قابلیت نفوذ کارآمد به سلول‌های PGC را دارند و می‌توانند سد غشای سلولی را به‌راحتی عبور کنند (۸)، دوم، این ویروس‌ها قادر به انتقال کاست‌های ژنی بزرگ حاوی سیستم CRISPR/Cas9 و ژن هدف هستند (۱۷). یکی از نکات کلیدی در کار با سلول‌های PGC، حفظ قابلیت زیستی و عملکرد طبیعی آن‌هاست. لنتی ویروس‌های مهندسی شده با سیستم CRISPR/Cas 9 طوری طراحی شده‌اند که حداقل اختلال را در فرآیندهای سلولی ایجاد کنند (۸). همچنین، امکان کنترل زمانی بیان ژن‌ها از طریق سیستم‌های القایی، دقت و انعطاف‌پذیری بیشتری را در فرآیند مهندسی ژنتیک فراهم می‌آورد (۱۸).

ژن *PDX1* به‌عنوان یکی از فاکتورهای رونویسی کلیدی در تکوین پانکراس، نقش محوری در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد سلول‌های پانکراسی دارد (۱۹). این ژن در تحقیقات تکوینی و مطالعات عملکردی، به‌عنوان مارکری مهم برای شناسایی و ردیابی سلول‌های با پتانسیل تبدیل به سلول‌های پانکراسی استفاده می‌شود (۲۰). فاکتور رونویسی *PDX* 1 برای تکوین اولیه پانکراس ضروری است و در بلوغ سلول‌های بتا نقش کلیدی ایفا می‌کند (۲۱). شایان ذکر است بخش کلون‌سازی ژن *PDX1* پیش‌تر در مطالعه‌ای از همین گروه پژوهشی که در همین مجله منتشر شده است، با جزئیات کامل گزارش شده و مبنای انجام مرحله تولید و ارزیابی ناقل لنتی‌ویروسی در پژوهش حاضر بوده است (۱۲).

هدف نهایی از این مطالعه، توسعه مدل حیوانی مهندسی شده با تکنولوژی CRISPR/Cas9 است که قابلیت‌های تحقیقاتی گسترده‌ای را در اختیار محققان قرار دهد. این مدل می‌تواند برای مطالعه فرآیندهای تکوینی، بررسی عملکرد ژن‌ها، و توسعه روش‌های درمانی جدید مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از جنین جوجه به‌عنوان مدل، مزایایی نظیر دسترسی آسان، هزینه کم و امکان مشاهده فرآیندهای تکوینی در زمان واقعی را ارائه می‌دهد. ترکیب قدرت سیستم CRISPR/Cas 9 با کارایی حامل‌های لنتی ویروسی، بستری منحصر به‌فرد برای دستکاری دقیق ژنتیکی ایجاد می‌کند. این رویکرد نه تنها امکان ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم را فراهم می‌آورد، بلکه قابلیت کنترل دقیق بیان ژن‌ها و مطالعه اثرات آن‌ها در سطح سلولی و ارگانیسمی را نیز ممکن می‌سازد. نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز پیشرفت‌های مهمی در حوزه مهندسی ژنتیک و توسعه مدل‌های حیوانی نوین باشد.

۲- مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی بود که به‌منظور تولید ذرات لنتی‌ویروسی حامل ژن PDX1 و ارزیابی کارایی انتقال آنها به سلول‌های جنینی جوجه انجام شد. در این مطالعه، تولید ذرات لنتی‌ویروسی طبق مراحل زیر انجام گرفت:

تولید ذرات لنتی ویروسی

کشت سلول‌های HEK293T-LentiX : سلول‌های HEK293T-Lenti از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (RSCB0787) تهیه شدند و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) با گلوکز کم (Bioidea، شماره کاتالوگ BI-1004، ایران)، همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی Fetal Bovine Serum (FBS) (DNAbioTech، شماره کاتالوگ DB9723، ایران) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت شدند.

آماده‌سازی برای ترانسفکشن: در روز ترانسفکشن، محیط کشت سلول‌ها با ۵ میلی‌لیتر محیط تازه DMEM/F12 (شرکت Gibco، آمریکا) تعویض شد و سلول‌ها به‌مدت ۲ ساعت در این شرایط قرار گرفتند.

فرآیند ترانسفکشن: برای تولید ویروس، از هر یک از پلاسمیدهای هدف در ظرف کشت ۱۰ سانتی‌متری طبق فرایند زیر استفاده شد:

۱. مقدار ۳ میکروگرم از پلاسمید لنتی‌ویروسی (شرکت Add Gene، ایران) به‌همراه ۳ میکروگرم از هر یک از پلاسمیدهای کمکی (شرکت Add Gene، ایران) در مجموع ۱۲ میکروگرم DNA پلاسمیدی در ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم (OptiMEM، شرکت Gibco، آمریکا)رقیق شد.

۲. به‌طور مجزا، ۳۶ میکروگرم ، معادل سه برابر جرم کل) Lipofectamine 2000 (شرکت Invitrogen، آمریکا) در ۱/۵ میلی‌لیتر محیط OptiMEM رقیق و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد.

۳. دو محلول DNA و Lipofectamine با یکدیگر مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، به کشت سلولی اضافه شد.

جمع‌آوری محیط حاوی ویروس و تخلیص ویروس: در روز دوم پس از ترانسفکشن (۱۲ ساعت بعد)، محیط کشت رویی حذف و محیط تازه روی سلول‌ها اضافه شد. در روز سوم (۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن)، محیط کشت حاوی ذرات لنتی‌ویروسی جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا روز بعد نگه‌داری شد. در روز چهارم (۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن)، محیط کشت مجددا جمع‌آوری و به محیط روز قبل اضافه شد. محیط ترکیبی از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری (شرکت Millipore، آمریکا) عبور داده شد. سپس محیط فیلتر شده به‌مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (دستگاه Eppendorf 5417R، آلمان) ذرات لنتی‌ویروسی در کف لوله‌ها رسوب کردند. پس از حذف محیط رویی، رسوب در محیط DMEM/F12 بدون سرم حل شد و به‌مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در نهایت، سوسپانسیون لنتی‌ویروسی در حجم‌های کوچک‌تر تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تعیین تیتر ذرات لنتی‌ویروسی: برای تعیین تیتر ذرات لنتی‌ویروسی حامل ژن گزارش‌گر GFP، از روش ارزیابی بیان GFP در سلول‌های ترانسداکت شده استفاده شد. مراحل کار به شرح زیر انجام شد:

مرحله اول، آماده‌سازی سلول‌ها و کشت اولیه: سلول‌های HT1080 از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (RSCB0787) تهیه شدند و در محیط کشت DMEM با گلوکز کم (Bioidea، شماره کاتالوگ BI-1004، ایران)، همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (شرکتGibco ، آمریکا) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت شدند. در روز اول آزمایش، ۲۰۰,۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت‌های شش چاهکی (شرکت TPP، سوئیس) تلقیح شد. در روز دوم، ویال‌های حاوی سوسپانسیون ویروسی از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد (شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) خارج و در دمای اتاق ذوب شدند.

مرحله دوم، تهیه رقت‌های ویروسی و ترانسداکشن: با استفاده از محیط کشت DMEM، رقت‌های سریالی از سوسپانسیون ویروسی در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر تهیه شد. محیط کشت موجود در هر چاهک با یکی از رقت‌های ویروسی تعویض و محلول polybrene (شرکتSigma-Aldrich ، آمریکا) به غلظت نهایی ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌هر چاهک اضافه شد. به‌منظور کنترل منفی، یک چاهک با محیط کشت فاقد ویروس در نظر گرفته شد.

مرحله سوم، ارزیابی بیان GFP و محاسبه تیتر: پس از گذشت ۷۲ ساعت از ترانسداکشن، سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس (شرکتOlympus ، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه دقیق تیتر ویروسی، تعداد سلول‌های بیان‌کننده GFP با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (شرکتBD Biosciences، آمریکا) تعیین شد. تیتر ویروسی نهایی بر مبنای واحد ترانسداکشن در میلی‌لیتر (TU/mL) مطابق فرمول زیر محاسبه و گزارش شد.

تیتر ویروسی = (TU/mL) تعداد سلول‌های GFP مثبت × فاکتور رقت / (حجم ویروس اضافه شده)(mL)

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه: برای جداسازی وکشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه CEF (Chick Fibroblast Cells)، تخم‌های بارور در مرحله ۱۵-۱۶ روزگی جنینی تحت شرایط استریل در هود لامینار (شرکتEsco ، سنگاپور) شکسته شدند. جنین‌ها به دقت استخراج و در محیط کشت DMEM (شرکتGibco ، آمریکا) قرار داده شدند. سپس با استفاده از قیچی و پنس استریل (شرکتFine Science Tools ، آمریکا)، قلب، سر و کیسه زرده جنین‌ها حذف شد. قسمت بدن باقی‌مانده جنین‌ها با قیچی استریل به قطعات کوچک ۱ تا ۲ میلی‌متری تقسیم شدند. قطعات بافتی در محلول ترپسین EDTA (شرکتSigma-Aldrich ، آمریکا) به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هضم شدند. پس از هضم آنزیمی، واکنش با اضافه کردن محیط کشت DMEM حاوی FBS، ۱۰ درصد متوقف شد. سوسپانسیون سلولی حاصل از طریق فیلتر ۷۰ میکرونی (شرکت BD Biosciences، آمریکا) عبور داده شده و سپس با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ (شرکت Eppendorf، آلمان) سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی FBS، ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر، (شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) مجددا رقیق شد. سلول‌های جداسازی شده در فلاسک‌های کشت T25 (شرکت TPP، سوئیس) حاوی محیط کشت کامل تلقیح و در انکوباتور CO_2 در شرایط ۳۷درجه سانتی گراد ، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد نگه‌داری شدند. محیط کشت هر ۲ تا ۳ روز یک‌بار تعویض شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد، با استفاده از محلول ترپسین-EDTA پاساژ داده شدند. هویت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه از طریق بررسی مورفولوژی مشخصه فیبروبلاستی تحت میکروسکوپ معکوس (شرکت Olympus، ژاپن) تایید شد.

جداسازی و کشت سلول‌های زایای اولیه *(PGC)*:برای جداسازی و کشت سلول‌های زایای اولیه Primordial Germ Cells (PGC) تخم‌های بارور در مرحله ۲/۵ روزگی جنینی تحت شرایط استریل در هود لامینار (شرکتEsco ، سنگاپور) شکسته شدند، سپس خون حاوی سلول‌های رگ آئورت پشتی از مرحله ۱۳ تا ۱۷ Hamburger& Hamilton (H&H) جنینی را جدا کرده و سلول‌های جدا شده از هر جنین را به طور جداگانه در ویال حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت (DMEM + FBS20%) انتقال داده و به‌مدت ۵ دقیقه با دور g۴۰۰ سانتریفیوژ خواهند شد. سپس پلیت سلولی سوسپانسیون شده به پلیت ۴۸ خانه‌ای

حاوی محیط کشت PGC انتقال خواهند یافت. خالص سازی، تفکیک و تشخیص این سلول‌های PGC از روی مورفولوژی (سلول‌های کروی مشخص با هسته‌های بزرگ)، انجام خواهد شد.

انتقال ذرات لنتی‌ویروسی به سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه: ذرات لنتی‌ویروسی نوترکیب حاوی ژن GFP از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج و در دمای اتاق ذوب شدند. برای هر چاهک، ۲ میکرولیتر از ذرات ویروسی با تیتر ۱۰۲ (TU/mL) با ۵ میکرولیتر معرف لیپوفکتامین ۳۰۰۰ (شرکت Invitrogen، آمریکا) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم Opti-MEM (شرکت Gibco، آمریکا) مخلوط شد. برای افزایش کارایی ترانسداکشن، محلول Polybrene(شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) به غلظت نهایی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد این مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا کمپلکس ترانسداکشن تشکیل شد.

ارزیابی بیان GFP: پس از گذشت ۲۴ ساعت از ترانسداکشن، محیط کشت تعویض شد و بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت میکروسکوپ فلورسانس مدل IX71 (شرکتOlympus ، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر فلورسانس و نور مرئی از نواحی مختلف هر چاهک با بزرگنمایی ×۲۰۰ ثبت شد.

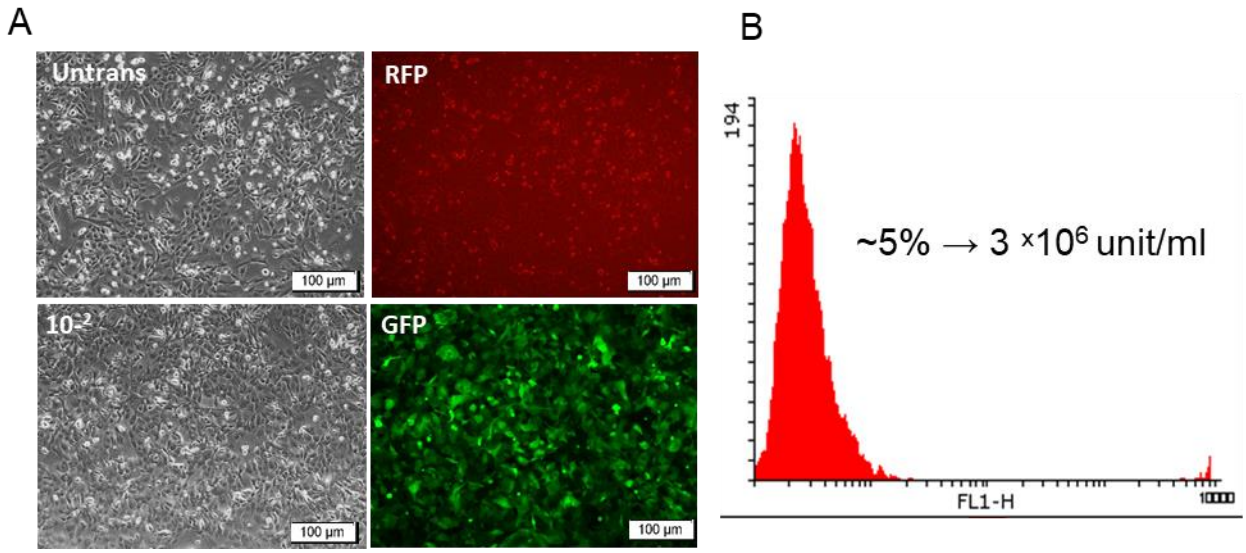
۴- نتایج

تولید و تایید ذرات لنتی‌ویروسی

پس از ترانسفکشن سلول‌هایHEK293T-LentiX ، بیان GFP به‌صورت گسترده و یکنواخت مشاهده شد (شکل A ۱). بیان GFP به‌صورت گسترده و یکنواخت مشاهده شد که نشان‌دهنده تولید موفق ذرات لنتی‌ویروسی بود. شدت فلورسنت در اغلب سلول‌ها قابل‌تشخیص بود و یکنواختی سیگنال بیانگر کارایی مناسب سامانه ترانسفکشن بود. این داده‌ها تولید اولیه ویروس را به‌طور کیفی تایید می‌کند.

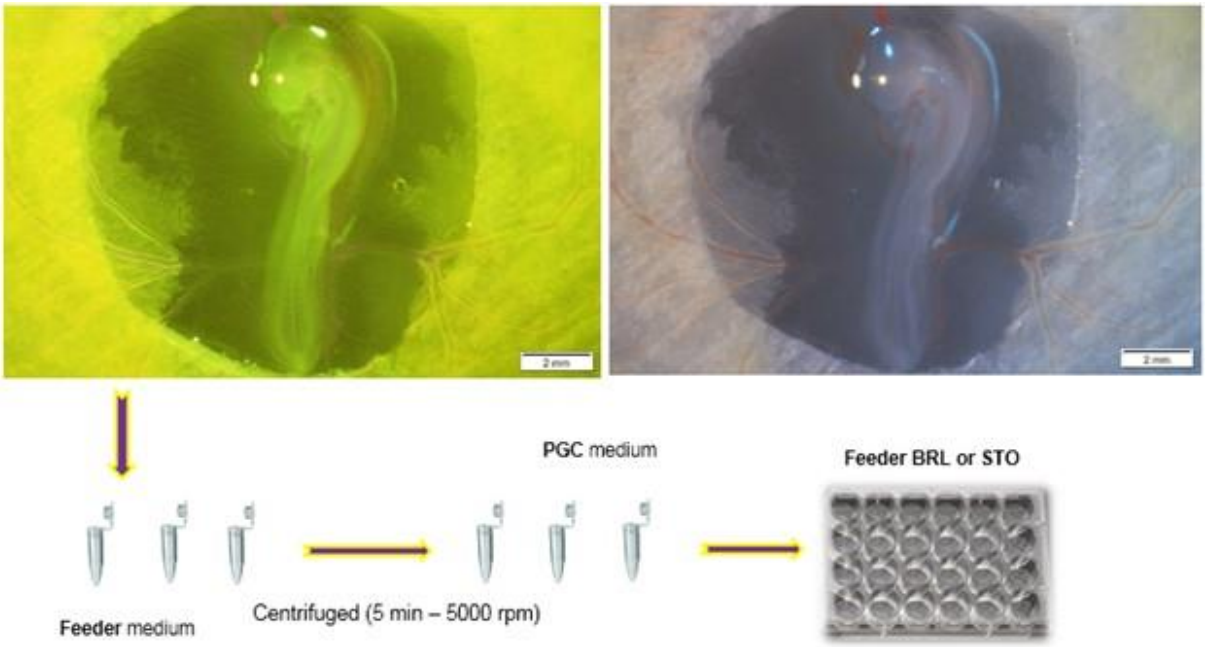
تعیین تیتر ویروس با فلوسایتومتری

برای تعیین کمی تیتر ویروس، از سلول‌های HT1080 برای سنجش تیتر استفاده شد و نتایج فلوسایتومتری صحت کار را تایید کرد (شکل B ۱). سلول‌های HT1080 با رقت‌های مختلف ویروس ترانسداکت شدند. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که در رقت $۱۰^{۲}$ درصد سلول‌های-GFP مثبت برابر با ۰/۱۹ ± ۰/۴۶ درصد بود. کاهش رقت ویروس منجر به افزایش قابل توجه درصد سلول‌های مثبت شد که نشان‌دهنده عفونت‌زایی مناسب ذرات تولیدشده است. نمودارهای فلوسایتومتری به‌وضوح جمعیت‌های مثبت و منفی را تفکیک کردند و قرارگیری پیک GFP در ناحیه فلورسنت بالا تاییدکننده ورود سازه نوترکیب بود.

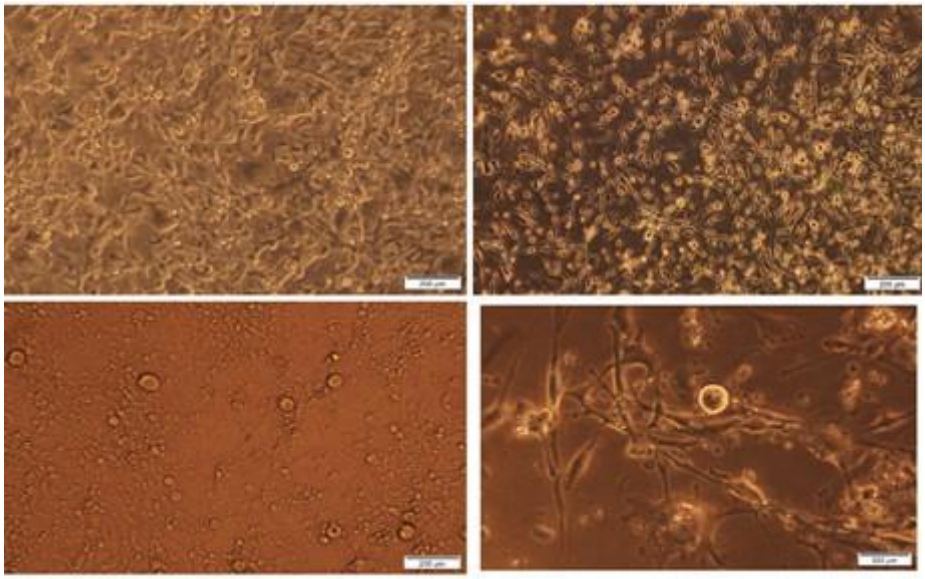


شکل۱: تیتر کردن ذرات لنتی‌ویروسی. (A) LentiCRISPRv2GFP-sg*PDX1*. بیان GFP پس از ترانسفکشن در سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس؛ گروه کنترل فاقد سیگنال بود. Scale bar = 100 µm (B) .تحلیل فلوسایتومتری کارایی ترانسداکشن در سلول‌های HT1080 با ذرات LentiCRISPRv2GFP-sg*PDX1*؛ در حالی‌که سیگنال در کنترل‌ها مشاهده نشد، رقت 10^{-2} موجب ترانسداکشن ۰/۱۹±۰/۴۶۶ درصد سلول‌ها شد.

A



B



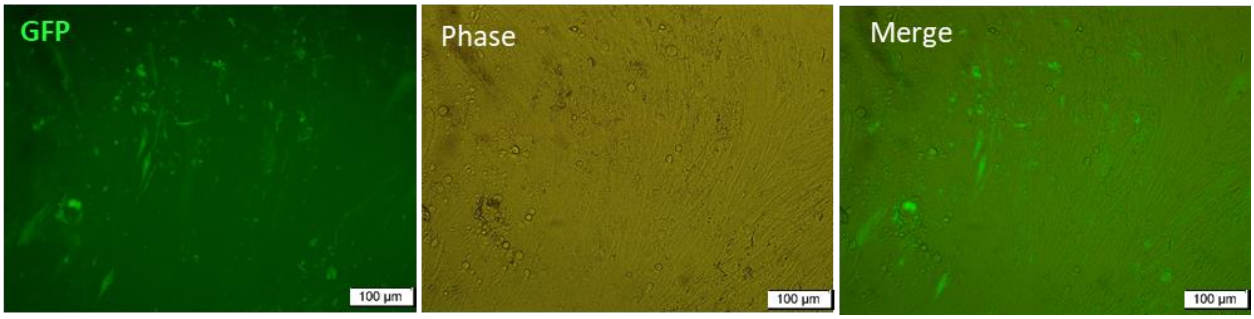
شکل ۲. جداسازی و کشت سلول‌های زایای اولیه (PGCs) از آئورت جنین جوجه.

(A)جمع‌آوری خون از آئورت پشتی جنین جوجه در مرحله HH14–16 و جداسازیPGC ها. خون ابتدا در محیط کشت اولیه در چاهک‌های ۹۶ ول کشت داده شد و سپس برای گسترش به چاهک‌های ۲۴ ول منتقل گردید.

(B)مشاهده کلونی‌های تشکیل‌شده از سلول‌های جنسی اولیه (PGCs) طی کشت. سلول‌های غیرچسبنده پس از یک روز از بافت گناد جدا شده و در ادامه رشد کلونی‌ها مشاهده شدند.

ترانسداکشن سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه

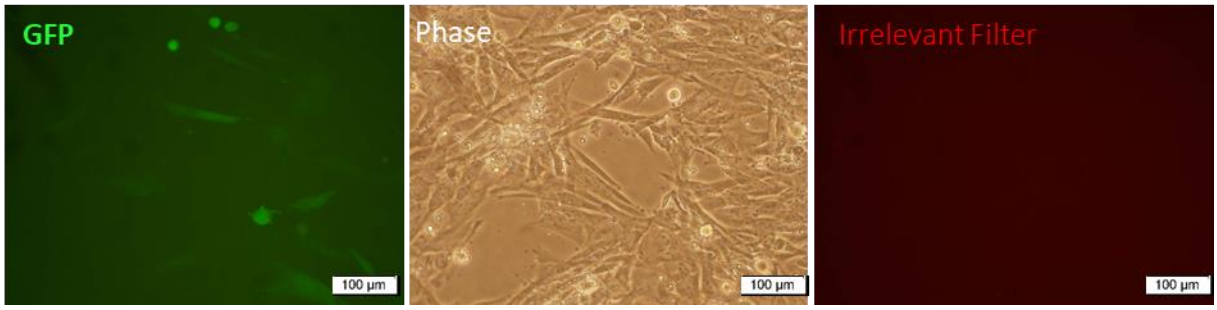
انتقال ذرات لنتی‌ویروسی به سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه (CEF) موجب بیان واضح GFP شد (شکل ۳). (CEF) منجر به بیان واضح GFP شد. توزیع یکنواخت سیگنال در کل چاهک نشان‌دهنده کارایی مناسب انتقال ژن است. مورفولوژی طبیعی سلول‌ها بعد از ترانسداکشن نیز حفظ شد و نشانه‌ای از سمیت مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که وکتور تولیدشده برای سلول‌های اولیه جنینی نیز قابل‌استفاده است.



شکل ۳: انتقال ذرات لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* به سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه (CEF). تصاویر میکروسکوپی فلورسانس بیان GFP در این سلول‌ها پس از انتقال ویروس نشان‌دهنده کارایی بالای ناقل‌های لنتی‌ویروسی در ترانسداکشن سلولی است . Scale bar = 100 µm

ترانسداکشن سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه (PGC)

سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه (PGC) پس از مواجهه با ویروس، بیان GFP را به‌طور واضح نشان دادند (شکل ۴). بیان GFPرا در سطح قابل توجهی نشان دادند. مشاهده کلونی‌های PGC دارای فلورسنت سبز تأیید می‌کند که ذرات لنتی‌ویروسی قادر به نفوذ به این سلول‌ها و واردسازی سازه ژنی هستند. پایداری بیان GFP طی چند روز کشت نیز نشان‌دهنده کارایی مناسب سیستم انتقال ژن در جمعیت سلول‌های فعال و تقسیم‌شونده است.



شکل ۴: انتقال ذرات لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* به سلول‌های زایای اولیه.(PGC) تصاویر میکروسکوپی فلورسانس بیان GFP در این سلول‌ها پس از انتقال ویروس نشان‌دهنده کارایی بالای ناقل‌های لنتی‌ویروسی در ترانسداکشن سلولی است Scale bar = 100 µm .

بر اساس یافته‌ها، ذرات لنتی‌ویروسی تولیدشده دارای تیتر بالا و قابلیت انتقال ژن به هر دو نوع سلول فیبروبلاست و زایای اولیه جنینی بودند. نتایج فلوسایتومتری و تصویربرداری فلورسنت به‌طور مکمل نشان دادند که سیستم طراحی‌شده قادر است ژن *PDX1*را با کارایی مناسب وارد سلول‌های هدف کند. مدل‌های حیوانی ، به‌ویژه جنین جوجه، به دلیل شباهت‌های تکوینی با انسان، دوره رشد قابل کنترل و دسترسی آسان، بستری مناسب برای مطالعه فرایندهای رشد، بیماری‌های متابولیک و بررسی عملکرد ژن‌ها هستند. از این منظر، ژن *PDX1* به عنوان یکی از عوامل کلیدی در تکوین پانکراس و تمایز سلول‌های انسولین‌ساز، هدفی ارزشمند برای مدل‌سازی بیماری‌هایی نظیر دیابت نوع یک محسوب می‌شود.

۵- بحث

در این مطالعه، تولید و انتقال ذرات لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* به سلول‌های جنینی جوجه با موفقیت انجام شد. ابتدا ذرات لنتی‌ویروسی در سلول‌های HEK293T-LentiX با تیتر بالا تولید شدند و سپس این ناقل‌های ویروسی نوترکیب به سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه منتقل شدند. وجود و عملکرد ناقل‌ها با استفاده از روش‌های میکروسکوپ فلورسانس و فلوسایتومتری تایید شد و بیان ژن GFP گزارشگر نشان داد که انتقال ژن با کارایی مطلوبی انجام شده است.

نتایج حاضر با مطالعات اخیر همسو است که نشان می‌دهد سیستم‌های لنتی‌ویروسی به دلیل توانایی انتقال ژن به سلول‌های تقسیم‌شونده و غیرتقسیم‌شونده، ظرفیت بارگذاری بالا و پایداری بیان ژن، ابزاری بسیار مناسب برای انتقال ژن در موجودات زنده هستند (۲۲, ۲۳). به‌عنوان مثال، تحقیقات جدیدی نشان داده‌اند که استفاده از پوشش‌های ویروسی خاص و روش‌های تزریق بهینه می‌تواند انتقال ناقل‌های لنتی‌ویروسی را به سلول‌های زایای پرندگان (PGCs) افزایش دهد و بدین‌ترتیب امکان انتقال پایدار ژن به نسل بعد را فراهم آورد. این نکته اهمیت زیادی دارد زیرا برای تولید پرندگان تراریخته، ضروری است که ژن واردشده به سلول‌های زایا منتقل شده و در نسل‌های بعد نیز حفظ شود (۹, ۱۰, ۲۴-۲۷).

ژن *PDX1* به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی در تکوین و تمایز پانکراس شناخته می‌شود و نقش کلیدی در تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سلول‌های تولیدکننده انسولین دارد (۲۸). انتقال موفق این ژن به سلول‌های جنینی جوجه، به ویژه به سلول‌های فیبروبلاست و زایای بدوی، می‌تواند زمینه‌ساز تولید مدل‌های حیوانی مناسب برای مطالعه بیماری‌های متابولیک مانند دیابت و نیز توسعه روش‌های نوین تولید پروتئین‌های درمانی باشد. علاوه بر این، کاربرد فناوری‌های جدید و دقیق مانند CRISPR/Cas9 در طراحی و ساخت ناقل‌های لنتی‌ویروسی باعث شده است تا انتقال ژن با دقت بالا و احتمال کاهش اثرات جانبی ناشی از ادغام تصادفی ژنوم انجام شود (۳۱-۲۹).

اگرچه نتایج این مطالعه مثبت و امیدوارکننده است، برای دستیابی به کاربردهای عملی در تولید پرندگان تراریخته و انتقال پایدار ژن، نیاز به تحقیقات بیشتر وجود دارد. یکی از مهم‌ترین جنبه‌ها، بررسی پایداری بیان ژن واردشده در طول زمان و در مراحل مختلف تقسیم و تمایز سلولی است. در بسیاری از موارد، بیان ژن‌های منتقل‌شده پس از مدتی کاهش یافته و این موضوع می‌تواند

به کاهش کارایی روش منجر شود. همچنین، بررسی انتقال ژن به سلول‌های خط گامت و اطمینان از انتقال آن به نسل‌های بعدی حیوانات تولیدشده، از اهمیت بالایی برخوردار است که می‌تواند گام مهمی در تولید پرندگان اصلاح‌شده ژنتیکی باشد.

موضوع دیگر، ارزیابی ایمنی زیستی ناقل‌های لنتی‌ویروسی و اثرات احتمالی آن‌ها بر روی سلول‌های میزبان است (۲۶, ۳۲, ۳۳). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که وارد کردن ژن‌های خارجی ممکن است اثرات خارج‌هدفی (off-target) به‌همراه داشته باشد که منجر به بیان ژن‌های ناخواسته، اختلال در مسیرهای سلولی یا حتی سرطان‌زایی شود (۱۸, ۳۴, ۳۵). به‌همین دلیل، بررسی‌های دقیق و طولانی‌مدت در این زمینه ضروری است. همچنین، استفاده از پروموترهای بافت‌مخصوص و زمان‌مند می‌تواند کمک کند تا بیان ژن در سلول‌ها به‌صورت کنترل‌شده و محدود به بافت هدف باشد و از عوارض جانبی ناشی از بیان بیش از حد یا خارج از محل جلوگیری شود (۱۴, ۳۶).

پیشرفت‌هایی که در روش‌های تزریق، پوشش‌دهی ویروس‌ها و طراحی ناقل‌ها به دست آمده، مسیر جدیدی را برای افزایش اثربخشی و کاهش عوارض جانبی در انتقال ژن هموار کرده است. به‌طور مثال، استفاده از تزریق چندمرحله‌ای ناقل در جنین جوجه، سبب افزایش انتقال به سلول‌های هدف و بهبود میزان انتقال ژن به سلول‌های گامت شده است (۲۴, ۳۱).

۶- نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که ناقل‌های لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* با موفقیت به سلول‌های جنینی جوجه منتقل شده و بیان ژن گزارشگرGFP ، کارایی مطلوب این روش را تایید کرد. با توجه به نقش کلیدی *PDX1* در تکوین پانکراس، این رویکرد می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد مدل‌های حیوانی مناسب برای بررسی بیماری‌های متابولیک و توسعه راه‌کارهای نوین درمانی باشد. با وجود نتایج امیدوارکننده، پایداری بیان ژن در طول زمان، انتقال آن به خط گامت و نسل‌های بعد، و همچنین ارزیابی جنبه‌های ایمنی زیستی، نیازمند بررسی‌های بیشتر است. بنابراین، تحقیقات آینده به ویژه در شرایط درون بدن برای تحقق کاربردهای عملی این فناوری در تولید پرندگان اصلاح‌شده ژنتیکی ضروری خواهد بود.

در نهایت، مطالعه ما نشان داد که ناقل‌های لنتی‌ویروسی حامل ژن *PDX1* می‌توانند به‌عنوان ابزاری مؤثر برای انتقال ژن به سلول‌های جنینی جوجه مورد استفاده قرار گیرند و پتانسیل بالایی برای تولید پرندگان اصلاح‌شده ژنتیکی و تحقیقات مرتبط با تمایز و توسعه پانکراس دارند. با این‌حال، توصیه می‌شود در مطالعات بعدی، علاوه بر ارزیابی درون محیط آزمایشگاه (in vitro)، عملکرد انتقال ژن در شرایط داخلی بدن(in vivo) نیز بررسی‌شود تا بتوان تأثیرات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی کامل این روش را ارزیابی کرد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از همکاری و پشتیبانی ارزشمند همکاران در آزمایشگاه تولید ویروس و آزمایشگاه سلول‌های بنیادی پرندگان، پژوهشگاه رویان صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

۸ -منابع

1. Chojnacka-Puchta L, Kasperczyk K, Pluciennicz‌ak G, Sawicka D, et al. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. 2012; 15(1).

2. Thomson JJS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. 1998;282.

3. Meng S, Miao A, Wu S, Du X, et al. Genetically modified chickens as bioreactors for protein-based drugs. Front Genome Ed. 2024; 6:1522837.

4. Zhao H, Comer L, Akram MZ, Corion M, et al. Recent advances in the application of microbiota transplantation in chickens. Journal of animal science and biotechnology. 2025; 16(1):91.

5. Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Nature protocols. 2014; 9(8): 1956-68.

6. Petersen B, Niemann H. Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. Transgenic research. 2015; 24(3): 381-96.

7. Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. Briefings in functional genomics. 2017; 16(1): 4-12.

8. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science (New York, NY). 2002; 295(5556): 868-72.

9. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia. 2018; 32(7): 1529-41.

10. Poletti V, Mavilio F. Designing Lentiviral Vectors for Gene Therapy of Genetic Diseases. Viruses. 2021; 13(8).

11. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. Nature. 2015;526(7573): 351-60.

12. Akhlaghpour A, Basiri M, Mobarak Qamsari M, Hassani S. Creation of a lentiviral recombinant construct containing the PDX1 gene using the CRISPR/Cas9 system %J Cell and Tissue Journal. 2025; 16(3): 277-90.

13. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2010;58(2):107-19.

14. Lu Z, Yao X, Lyu P, Yadav M, et al. Lentiviral Capsid-Mediated Streptococcus pyogenes Cas9 Ribonucleoprotein Delivery for Efficient and Safe Multiplex Genome Editing. The CRISPR journal. 2021; 4(6): 914-28.

15. Dong W, Kantor B. Lentiviral Vectors for Delivery of Gene-Editing Systems Based on CRISPR/Cas: Current State and Perspectives. Viruses. 2021; 13(7).

16. Lee KY, Choi HJ, Park KJ, Woo SJ, et al. Development and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated RAG1 knockout chicken model lacking mature B and T cells. Frontiers in immunology. 2022;13:892476.

17. 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. 2017; 18(4): 532.

18. Ezaki R, Ichikawa K, Matsuzaki M, Horiuchi HJTJoPS. Targeted knock-in of a fluorescent protein gene into the chicken vasa homolog locus of chicken primordial germ cells using CRIS-PITCh method. 2022; 59(2): 182-90.

19. Tanihara F, Hirata M, Thi Nguyen N, Anh Le Q, et al. Generation of viable PDX1 gene-edited founder pigs as providers of nonmosaics. 2020;87(4):471-81.

20. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. Genes & development. 2008; 22(15): 1998-2021.

21. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, et al. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. Molecular metabolism. 2017; 6(9): 943-57.

22. Motono M, Yamada Y, Hattori Y, Nakagawa R, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. 2010; 109(4): 315-21.

23. Velho TA, Lois CJCSHP. Generation of transgenic zebra finches with replication-deficient lentiviruses. 2014; 2014(12): pdb. prot084608.

24. Jiang ZQ, Wu HY, Tian J, Li N, et al. Targeting lentiviral vectors to primordial germ cells (PGCs): An efficient strategy for generating transgenic chickens. Zoological research. 2020;41(3):281-91.

25. Motono M, Yamada Y, Hattori Y, Nakagawa R, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. Journal of bioscience and bioengineering. 2010; 109(4): 315-21.

26. Naseri D, Dormiani K, Hajian M, Jafarpour F, et al. Improving germline transmission efficiency in chimeric chickens using a multi-stage injection approach. PloS one. 2021; 16(6): e0247471.

27. Hen G, Yosefi S, Shinder D, Or A, et al. Gene transfer to chicks using lentiviral vectors administered via the embryonic chorioallantoic membrane. PloS one. 2012; 7(5): e36531.

28. Fujimoto K, Polonsky KSJD, obesity, metabolism. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β-cell survival. 2009; 11: 30-7.

29. Khwatenge CN, Nahashon SNJFiG. Recent advances in the application of CRISPR/Cas9 gene editing system in poultry species. 2021; 12: 627714.

30. Gandhi S, Piacentino ML, Vieceli FM, Bronner MEJDb. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. 2017; 432(1): 86-97.

31. Abu-Bonsrah KD, Zhang D, Newgreen DFJSR. CRISPR/Cas9 targets chicken embryonic somatic cells in vitro and in vivo and generates phenotypic abnormalities. 2016; 6(1): 34524.

32. Chojnacka-Puchta L, Sawicka D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. Journal of Applied Genetics. 2020: 1-9.

33. Poletti V, Mavilio FJV. Designing lentiviral vectors for gene therapy of genetic diseases. 2021; 13(8): 1526.

34. Parman T, Pizzurro DM, Lucas J, Peng Z. Mutagenesis and Carcinogenesis Risk Evaluation for AAV and Lentiviral Gene Therapies. International journal of toxicology. 2025; 44(3): 183-95.

35. Aboelhassan DM, Abozaid H. Opportunities for CRISPR-Cas9 application in farm animal genetic improvement. Molecular biology reports. 2024; 51(1): 1108.

36. Chojnacka-Puchta L, Sawicka D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. Journal of applied genetics. 2020; 61(2): 221-9.