مجلة بغداد للعلوم **مجلد 7(1) 2010**

الحقن المباشر للجينات بأستخدام مستحلب صفار البيض كمادة ناقلة ومقارنته بمادة اللايبوسوم الصناعية

علي عبد الرحمن الزعاك* ***هديل وليد المشهداني ****

تاريخ قبول النشر 1 /3/ 2010

الخلاصه

درست كفاءة مستحلب صفار البيض في تغليف الدنا لنقله عبر الاغشية الخلوية و التعبير عنه مقارنة بمادة اللايبوسوم الصناعيه نوع DOPE .

استخدم لهذا الغرض الجين المسرطن الاولي v-abl المسؤول عن الاصابه بسرطان الدم مستنسلاً على بلازميد pBR322، و بعد تغليفه بمادة مستحلب صفار البيض مرة و بمادة اللايبوسوم مرة اخرى كنموذج سيطرة موجب ، ثم أجريت دراسه طيفيه على المعقدات المتكونه اذ لوحظ حصول تغيرا طيفياً لمعقد المستحلب مع البلازميد مقارنتا بالمستحلب الحر.

حقنت المعقدات في النسيج البريتوني (IP) للفئران المختبريه وحقنت مجموعة اخرى بالمحلول الدارئ المستخدم في تحضيرها كنموذج سيطرة سالب .

كشف عن انتقال الجين و التعبير عنه جزيئياً باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا و بوجود بوادئ نوعيه تستهدف البلازميد pBR322 الحامل للجين المنقول و الذي اظهر اندماج جين v-abl في مجين الخليه المضيفة بعد مرور 48 ساعه من تاريخ الحقن و تحلل البلازميد الحامل له ، ومظهرياً بأجراء فحوص الدم و الوراثة الخلوية ، حصل تغير في الاعداد الكروموسوميه لخلايا نخاع العظم للفئران المحقونه بالمركبات بعد مرور اربعة ايام .

اما بالنسبه للدم فقد حصل نقصان في عدد كريات الدم البيضاء مع زياده في نسبة الخلايا اللمفيه و زيادة في حجومها بالاضافة الى ظهور كريات الدم الحمراء باشكال غير طبيعيه فاقده لصبغتها ، و هذا يشير الى الاصابة بسرطان الدم اللمفي الحاد .

اظهرت الدراسة التشريحيه للفئران المصابه زيادة في حجم الطحال بحوالي 25% من حجمه الطبيعي كما لوحظ حصول تضخم في الكبد و احتقان اللوزتين .

الكلمات المفتاحية: صفار البيض ، اللايبوسوم الصناعية DOPE

المقدمة :

تعد عملية ايصال الجينات الى خلايا النسيج الحي وضمان سلامته وعدم تحلله او تحطمه واحدة من اهم متطلبات العلاج الجيني الرئيسة.[1] اذ تحتاج هذه العمليه الى ناقل ذي خصوصية عالية في الاستهداف الخلوي وله القابلية على تمييز المستلمات على سطح الخلايا الهدف اذ تقسم النواقل بصورة عامه الى نواقل فايروسيه (Viral Vectors) و التي تعتمد على مجين الفايروس و اغلفته ناقلا للجين ، و نواقل لافايروسيه (Non Viral Vectors) تعتمد على البلازميدات في نقل الدنا.[2 , 3]

ان استخدام النواقل الفايروسيه لا زال ضمن النطاق المختبري لتسببه بحدوث طفرات وراثيه و اثارته للاستجابه المناعيه ، و يُعدّ انتاجها بتراكيز عاليه من اهم العوائق في استخدامها . [4 ، 5] الا ان النواقل اللافايروسيه تتميز بأمكانيتها على استيعاب حجوم كبيره من الماده الوراثيه و انخفاض كلفة انتاجها و تحضيرها ، لكنها تحتاج الى مواد تساعدها على الانتقال عبر الاغشيه الخلويه .[6] تعتبر الجسيمات الدهنية الموجبة الشحنة من الانظمة الكفؤه لنقل المادة الوراثية الى الخلية الحية والتعبير عنها على مستوى التجارب المختبرية والسريرية على حد سواء [7] كما وتعتبر من الطرق السهلة الاستخدام مقارنة بالطرق الفيزيائية والكيميائية الاخرى مثل الترسيب بالفوسفات و DEAE ....الخ واقلها كلفة [8] حيث تعمل على زيادة فرص التعبير المباشر للجين وهو عاري (Naked DNA) [9] اذا تكون معقدات مع RNA/DNA بصورة تلقائية و تتميز هذه المعقدات بكونها غير سامة للجسم ولا تثير الاستجابة المناعية [10]

الجسيمات الدهنيه هي عباره عن دهون فوسفاتيه صناعية تحمل شحنه معاكسه لشحنة الدنا السالبه . (Cationic Lipid) عند هدرجة هذه الدهون في

* معهد الهندسه الوراثيه و التقنيات الاحيائيه للدراسات العليا / جامعة بغداد .
** قسم التقنيات الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد .

الماء ستكون حويصلات متعددة الطبقات (Multilamellar Vesicles) التي ترتبط مع الاحماض النووية مكونة معقدا مستقرا لتسهيل عملية دخولها الى الخلية من خلال آلية الالتهام (Endocytosis) . [11، 12، 13]

تضمنت هذه الدراسه استخدام مستحلب صفار البيض (Egg Yolk Emulsion)عاملاً ناقلاً جديداً و طبيعياً للدنا و مقارنته بمادة اللاييوسوم الصناعيه من نوع DOPE في مجال الدراسة المتعلقه بتطوير العوامل الناقله و دراسة مواصفاتها داخل الجسم الحي (*In vivo*) .

اذ أن صفار البيض هو عبارة عن نظام معقد يحتوي على مركبات مختلفة في محلول بروتيني يسمى الليفتين (Livetine) تبلغ قيمة المواد الصلبة الكلية في صفار البيض الطازج حوالي 52-53% وتُعدّ البروتينات والدهون المكونين الرئيسين للمواد الصلبة المتواجدة فيها مع كميات قليلة من الكاربوهيدرات والمعادن . تبلغ نسبة الدهون فيه حوالي 32% - 35% . وتتالف الدهون الموجودة في صفار البيض من الكليسيردات الثلاثية (Triacylglyceride) بنسبة 66% والدهون الفوسفاتية (Phosphplipids) بنسبة 28% والكولسترول(cholestrol) بنسبة 5% مع كميات ضئيلة من مواد دهنية اخرى . [14]

المواد وطرائق العمل:

المواد:

p-v-abl plasmid (Institute of Genetic Engineering & Biotechnology / University of Baghdad) figure -1 [15] , Freshly egg yolk (Baghdad / Iraq) , TFX^{Tm} -20 Reagents for the Transfection of Eukaryotic cells Kit & PCR-core System II Kit (Promega) , Primers (Alpha DNA) :

Primer 1 : (5-CCATTCAGGTCGAGGTGGCCC-´3)

Primer 2 : (5-CGCAGTCAGGCACCGTGTATG-´3)

DiSodium citrate (Merck) , Ethylene di amine tetra acetic acid (Na_2 EDTA) (Fluka) , Tris- base (HI-Media) , 6 – 8 Week old Balb/C mices (Institute of Genetic Engineering & Biotechnology/University of Baghdad)

طرائق العمل :

1 – تحضير مستحلب صفار البيض :

حُضِرَ محلولاً مستحلباً مستقراً من مادة صفار البيض باختبار أربع محاليل في تحضيره هي :

- محلول دارئ Tris - Na_2EDTA (PH = 8) [16].
- محلول سترات الصوديوم (PH =7.4) . [17]
- محلول دارئ سترات الصوديوم (PH = 8) .
- ماء خالي من الايونات . [18]

اذ حُضرت المستحلبات و قيست استقراريتها وفق ما جاء في كلا من الدسوقي [17] و [18] حيث استخدم محلول دارئ سترات الصوديوم Horrivan & MtCance في تغليف الدنا لأنه أكثر المحاليل استقرار .

2 – تغليف الدنا بكلاً من مستحلب صفار البيض ومادة اللاييوسوم كنموذج سيطرة موجب :

(النقاوة 1.8) مع مستحلب صفار البيض بنسبة مزج الدنا البلازميدي 1:1p-v-abl و مع مادة اللاييوسوم بنسبة 4:1 ثم لوحظت المعقدات المتكوّنة تحت المجهر .

3 – أجراء قياسات طيفيه للمعقد مستحلب صفار البيض مع الدنا :

اجريت عملية مسح Scaning بجهاز المطياف الضوئي للاشعة فوق البنفسجية من 200 نانوميتر الى 600 نانوميتر للمعقد المتكوّن و المستحلب الحر لمقارنة النتائج مع التغيرات التي يمكن ان تحدث في حالة تكون مركب جديد . [19]

4 – حقن المعقدات في الفئران المختبريه :

قسمت 24 فأرة نوع Balb\C اعمارها 8 – 10 أسابيع الى ثلاثة مجاميع ثمانية فأرات لكل مجموعة حقنت مجموعتين منها بكمية (100) مايكروليتر من كل من معقد مستحلب صفار البيض مع الدنا (المجموعة الاولى)و معقد اللاييوسوم مع الدنا (المجموعة الثانية) كنموذج سيطرة موجب تحت الغشاء البيريتوني (IP) للفأر (بين البطن والفخذ الايسر) بعد تعقيم المنطقة بالكحول الاثيلي (70%) كما و حقنت المجموعة الثالثة من الفئران بنفس الكميه من المحلول الدارئ المستخدم في تحضير هذه المعقدات كنموذج سيطره سالب .

5 – جمع العينات و أجراء الفحوصات اللازمه :

جمعت عينات الدم خلال فترات زمنيه متفرقة من تاريخ الحقن من كل فأرة على حدة من المجاميع الثلاثة بقتلها بطريقة طعنه القلب ووضع الدم في أنابيب معقمة حاوية على مادة مانعة للتخثر لإجراء الفحوص المتعلقة بالدم و لغرض استخلاص الدنا منه [16]، بعدها تشريح الفأر وأخذت عينة من

Unfiled Notes Page 2

النخاع العظمي من عظمة الفخذ والساق ليتم دراستها على مستوى الوراثة الخلوية [20] .

6 - التفاعلات التضاعفية لسلسة الدنا :

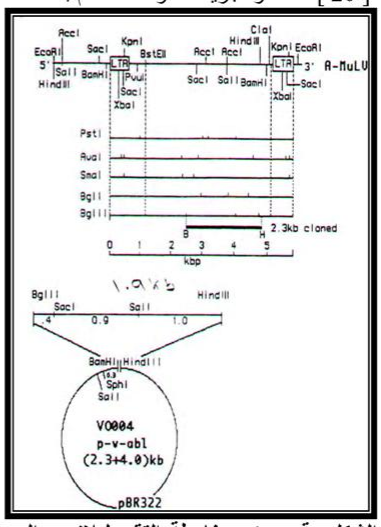
استخدمت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (Polymerase Chain Reaction (PCR

لسلسلة الدنا البلازميدي المراد نقله باستخدام بوادئ نوعيه متخصصة لتتابع جين التراسايكلين للبلازميد pBR322 الحامل للجين v-abl ، ثم ثبتت الظروف المثلى لتضاعف هذا الجزء من البلازميد قبل حقنه لتطبيقها على نماذج الدنا المستخلصة من دم الحيوان بعد عملية حقن المعقدات .

طبق البرنامج الذي يتضمن دوره واحده عند درجه حراره (95) مئويه مدّة(2) دقيقه لفك ارتباط شريطي الدنا القالب ، تبعه (32) دوره تضمنت كل منها ثلاث مراحل : أولها لإعادة مسخ الدنا في كل دوره و كانت درجة الحرارة (94) مئويه مدّة (60) ثانيه ، ثم مرحله ثانيه والتي تسمح بتهجين البادئ بالتسلسل المكمل له و ذلك عند درجة الحراره (50) مئويه مدّة (60) ثانيه اما المرحلة الثالثة و هي مرحلة الاستقطاب فتمثل بدء عملية تضخيم تتابع الدنا المستهدف و كانت درجة (72) مئويه مدّة (60) ثانيه .

7 - التشخيص الخلوي للاصابه :

فحصت نماذج نخاع العظم للمجاميع المحقونة بالمعقدات ونموذج السيطرة خلال فترات زمنية مختلفة من تاريخ الحقن واجريت فحوصات للوراثة الخلوية لدراسة التغيرات الكروموسوميه وفق ما جاء به Allen & Latt [20] ، كما و أجريت فحوصات للدم .



الشكل رقم – 1 : خارطة التقيد لبلازميد الـ V-abl حيث يظهر جين A-MuLV (1.9 Kb)

مستنسلاً على بلازميد pBR322 في موقع الانزيم القاطع *HindIII & BamHI* . [15]

النتائج و المناقشه :

نظرا لاحتواء صفار البيض على نسبة عالية من الدهون (35 %) أضيفت مواد تساعد على زيادة ثباتية المستحلب ، فالدهون الفوسفاتية الموجودة بنسبة (28%) [14] تقلل من القابلية على الاستحلاب حيث سرعان ما تنفصل عن الطور المائي بعد تركها مدّة من الزمن،فحصت استقرارية المستحلب باستخدام اربعة محاليل مائيه في تحضيره ، فقد ظهر ان المستحلب المحضر من محلول دارئ سترات الصوديوم اكثرالمستحلبات استقرارا و يعود ذلك لوجود الملح ضمن هذا الوسط مما قلل تجمع الحبيبات الدهنيه الموجوده في صفار البيض و زاد من بقائها عالقه في المحلول و هذا ما جعل المستحلب اكثر ثباتا [17] كما ان المحلول الذي حضر منه المستحلب ذو الرقم الهيدروجيني (8) أثر على حجم السائل المحجوز داخل اللاييوسومات المتكوّنه في هذا المستحلب [21] حيث ان للرقم الهيدروجيني أهميه في زيادة استقرارية التغليف عن طريق التاصر الهيدروجيني بين الفوسفولبيدات الموجبة الشحنه و الدنا ذي الشحنة السالبة المحجوز في رقم هيدروجيني قاعدي [22] . نظرا للزوجة المستحلب فقد تم تخفيفه بمزجه مع دنا البلازميدي بنسبة 1:1 و ذلك للتقليل من لزوجته و من ثمّ تزداد كفاءته في الانتقال عبر الاغشية الخلوية و سهولة تحلله داخل السايتوبلازم لتحرير البلازميد و انتقاله الى النواة [23] .

أستخدم المجهر لرؤية شكل المعقد المتكوّن من الدنا مع مستحلب صفار البيض ومقارنته بمعقد اللاييوسوم الذي يظهر بشكل حويصلات منتفخه دائرية شكل – 2 في حين ظهر شكل التغليف للمستحلب بهيئة حويصلات بيضويه منتفخة شكل – 3 دلالة على نجاح عملية التغليف بتكوّن بعض اللاييوسومات داخل المستحلب واحتجازها للدنا اذ تختلف اللاييوسومات المتكونة (DNA/liposome complex) من حيث الشكل الخارجي فمنها ما يكون بيضوياً ومنها كروياً ومنها يمتلك شكلا غير منتظم كما وقد يختلف لونها ايضاً اعتماداً على لون محاليل النماذج[24] .

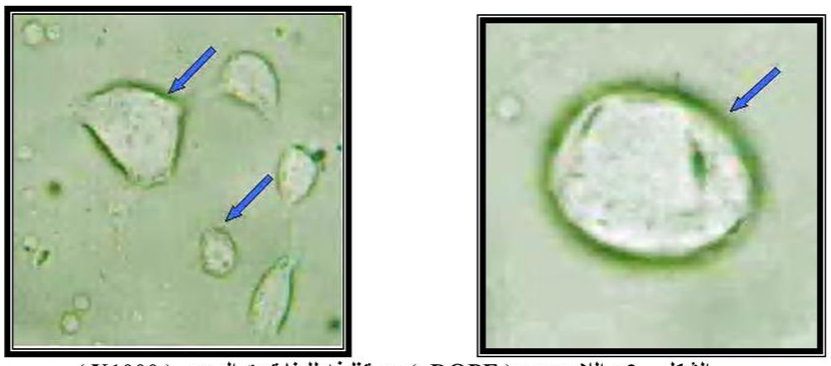
اجري مسحا للاطوال الموجيه من 200 الى 600 نانوميتر لكل من المعقد المتكون من مستحلب صفار البيض و البلازميد المراد نقله (v-abl) و المستحلب الحر كنموذج سيطره لمقارنة النتائج مع المتغيرات التي تحدث في حالة تكون مركب جديد جدول رقم – 1 و من خلال الرسم البياني للنماذج في شكل – 4 لوحظ ما يأتي :

ظهور ثلاث قمم لذروة الامتصاص لنموذج المعقد : الاول بطول موجي (255.5) نانوميتر العائده

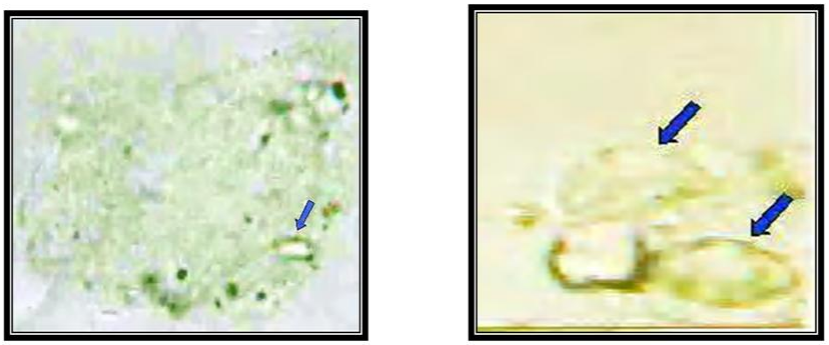
Unfiled Notes Page 3

لامتصاص حلقة البيورين Purine ، اذ ان البيورينات و البريميدينات هي الوحدات التي تمتص الاشعه فوق البنفسجيه في الحوامض النوويه و مشتقاتها ، اما فضلات السكر فتكون شفافه فوق (200) نانوميتر،وهذا يعني ان الدنا قد حافظ على تركيبه الكيميائي . اما القمتين الاخريين فهما قريبتان من بعضهما من حيث الاطوال الموجيه وهي عائده لنموذج المعقد المتكون فهي قمم ذروة امتصاص جديده بالمقارنه مع قمم ذروة الامتصاص لنموذج مستحلب صفار البيض الحر هذا قد اعطى انزياح للقمه عن موقعها الاصلي للمستحلب الحر مما يشير الى تكون مركب جديد بتآصرات جديدة بين الدنا و المستحلب . [25]

استخدمت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) للكشف عن انتقال البلازميدالحاوي على جين v-abl و اندماجه في مجين الخلايا باستخدام بوادئ نوعيه متخصصة لتتابع جين التتراسايكلين للبلازميد pBR322 (الحامل للجين) و بعد تثبيت الظروف المثلى لتضاعف هذا الجزء من البلازميد قبل حقنه شكل – 5 طبق البرنامج نفسه على نماذج الدنا المستخلصه من دم الحيوان بعد عملية حقن المعقدات ،حيث اظهرت النتائج اندماج جين v-abl في مجين الخليه المضيفة بعد مرور 48 ساعه من تاريخ الحقن و تحلل البلازميد الحامل له اذ لم يحصل تضخيم لجين المقاومه للتتراسايكلين للبلازميد الحامل للجين المنقول شكل – 6 . هذا يشير الى نجاح عملية الانتقال كما ظهر فيما بعد في نتائج فحوص الوراثة الخلوية و فحص الدم بعد مرور 4 الى 10 ايام من تاريخ الحقن ، فنظرا لتركيب جزيئي اللايبوسوم فان له القابلية على الاندماج مع غشاء الخلية البلازمي من خلال الحفر (فجوات) الموجود في الغشاء ليكوّن غلافاً في جدار الخلية يعرف بالجسيم الداخلي (Endosome) بآلية الالتهام (Endocytosis) [26] ففي عملية الانتقال هذه يهدم غشاء الجسيم الداخلي ويحرر الدنا الى السايتوبلازم نتيجة لاختلاف الضغط التناضحي بين داخل الجسيم الداخلي (خواص المحلول الدارئ للمعقد) وخارجه عند تحطم تركيب الجسيم الداخلي يحصل تكسر لمعظم جزيئات الدنا الداخلة الى الخلية والجزء القليل يمكنه التحرر والدخول الى النواة في مرحلة Mitosis بآليات غير معروفة . [27]



الشكل – 2 : اللايبوسوم (DOPE) بعد تغليفه للدنا تحت المجهر (X1000)

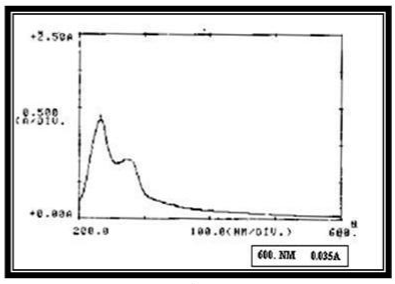


الشكل – 3 : مستحلب صفار البيض بعد تغليفه للدنا تحت المجهر (X1000)

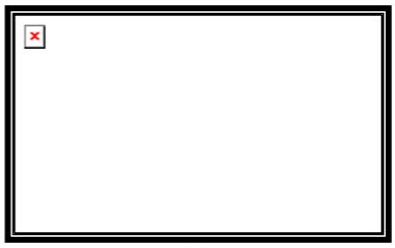
جـدول 1 : قـيم الأطـوال الموجيـة لقمـم ذروة الامتصاص لنموذج المستحلب الحر و معقده مع الدنا .

النموذج	قيمة الطول الموجي لذروة الامتصاص (نانوميتر)	الامتصاصية
معقد مستحلب صفار البيض / الدنا	355.5	0.787
	350.5	0.770
	255.5	2.478
مستحلب صفار البيض (نموذج سيطره)	232	1.339

A



B



شـكل – 4 : **امتصاصـية النمـاذج المسـتخدمه (X = الأمتصاصية ، Y =الطول الموجي) :**

A : - الرسم البياني لمستحلب صفار البيض الحر ظهور قمة واحدة في طول موجي 232 نانوميتر

B : - الرسم البياني لمعقد مستحلب صفار البيض / v-abl ظهـور قمتـين متقـاربتين فـي الاطـوال الموجيـة (355.5) و (350.5) نـانوميتر وازاحـة القمـة الاصلية الـى طـول موجي (255.5) نانوميتر مع ملاحظة تغير الامتصاصية عند الطول الموجي 600 نانوميتر .

الشكل – 5 : ناتج تضخيم الجين المقاوم للتتراسايكلين للبلازميد pBR322 الحامل لجين A – MuLV قبل عملية الحقن

المسار (1) ناتج التضخيم .

المسار (2) البلازميد v-abl قبل عملية الحقن .

الشكل – 6 : الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي باستخدام بوادئ نوعية لجين المقاومه للتتراسايكلين حيث المسار رقم (1) يمثل ناتج تضخيم نموذج السيطرة الموجب اما المسار من (2 الى 5) فيمثل ناتج التفاعل التضاعفي الخاص بنماذج الدنا المستخلصة من دم الفئران المصابة بعد 48 ساعة من عملية حقن المعقدات .

لوحظت تغيرات عديه لكروموسومات الخلايا في طور ال Metaphase في اليوم الرابع من تاريخ

Unfiled Notes Page 5

الحقن فكانت نسبة الخلايا التي عانت من تغير في اعدادها الكروموسوميه الى الخلايا الطبيعيه حوالي 50% لمعقدات اللاييوسوم و مستحلب صفار البيض مع البلازميد في حين لم يحصل اي تغير وراثي لخلايا النخاع العظم للمجاميع المحقونه بالمحلول الدارئ فقط (جدول – 2)، دلالة على حصول اضطرابات وراثيه حيث ازدادت نسبة الخلايا التي حصل فيها تغير في الاعداد الكروموسوميه لتصل ذروتها بعد (22) يوماً من بدأ الحقن بالمعقدات وبعدها لوحظ هلاك الحيوانات المتبقية قبل أخذ عينات الدم و نخاع العظم منها ، وهذا مؤشر على نجاح عملية الانتقال و التعبير عن الجين المسرطن v-abl داخل جسم الحيوان المحقون .

اخذت صوره كامله للدم وفحص تحت المجهر بعد عشرة ايام من الحقن لتشخيص نوع سرطان الدم الناتج من نقل v-abl فلوحظ زياده في الخلايا اللمفيه بنسبه عاليه مقارنه بنسبتها الطبيعيه في الدم لكلا المجموعتين و زيادة غير طبيعيه في حجومها ، بالاضافه لنقصان في عدد كريات الدم البيضاء لتراكمها في الكبد والطحال والعقد اللمفيه (Lymph Node) (جدول – 3) . اما كريات الدم الحمراء فلوحظ عدم تصبغها بصبغتها الطبيعيه و ظهورها باشكال غير طبيعيه (الشكل - 8) ، وبناءً على النتائج اعلاه فان سرطان الدم المستحث هو من نوع سرطان الدم اللمفي الحاد (ALL) (Acute Lymphoblastic Leukemia) . [28 ، 29]

تم اجراء فحص تشريحي للحيوانات المصابه ولوحظ حصول نزيف للوزتين و احتقان الطحال مع زياده في حجمه بحوالي 25 % من حجمه الطبيعي كما لوحظ تضخم الكبد ايضا وذلك بعد (18) يوم من الحقن وهذا يدل على الاصابه المتقدمه من مرض سرطان الدم [30] .

في هذا النوع من السرطان (ALL) يحصل تكاثر للخلايا اللمفيه غير الناضجة الفاقده لوظيفتها) (Non Functioning Cells لتزاحم خلايا الدم الطبيعيه و تتجمع في العقد اللمفيه مما يؤدي الى تورمها [28] .

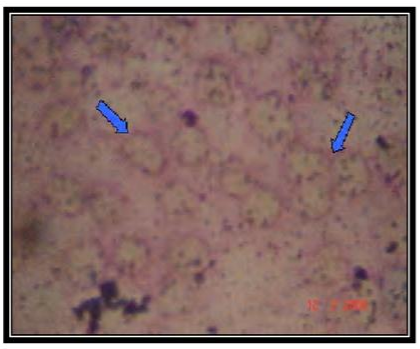
ان الجين المنقول والمشتق من الفايروس الراجع Abelsone Murin Leukemia Virus يعمل على احداث تغيرات كروموسوميه ، حيث يتكون ال Philadelphia Chromosome المسؤول عن أنتاج انزيم Tyrosine Kinase ذوالوزن الجزيئي 190 كيلو دالتون التي تؤدي الى الاصابه بسرطان الدم اللمفي الحاد. [31 ، 32]

جدول – 2 : نسب المعقدات المحقونة والتغيرات الوراثيه بعد الحقن و الاعداد الكروموسومية لخلايا نخاع العظم في طور Mitosis .

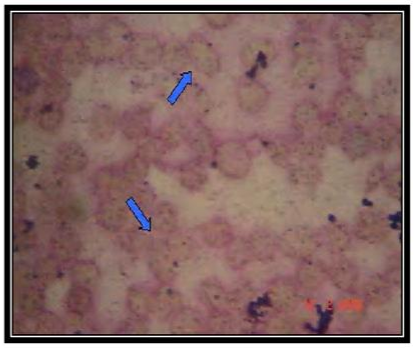
نوع المادة المحقونة	نسبة العامل الناقل للبلازميد	الفترة الزمنية بعد تاريخ الحقن (بالايام)	نسبة الخلايا التي تعاني تغيرا في الاعداد الكروموسومية
معقد اللاييوسوم / الدنا	1:4	(4)	%55
		(11)	%83
		(18)	%92
		(22)	هلاك
معقد مستحلب صفار البيض / الدنا	1:1	(4)	%50
		(11)	%82
		(18)	%90
		(22)	هلاك
محلول رقم (9) دارئ السيطره	%100	(4)	%1-0
		(11)	%1-0
		(18)	%1-0
		(22)	%1-0

جدول رقم -3 : اعداد كريات الدم البيضاء و نسبة الخلايا اللمفية فيها لنماذج الدم من المجاميع المعاملة بالمعقدات نسبة الى اعدادها الطبيعية .

نوع المعامله للمجموعة المحقونه	عدد كريات الدم البيضاء (X1000/ml)	عدد كريات الدم البيضاء الطبيعية (X1000/ml)	نسبة الخلايا اللمفية (%)	نسبة الخلايا اللمفية الطبيعية (%)
معقد اللاييوسوم	2	5.4-16	75	8-43
معقد مستحلب صفار البيض	3	5.4-16	73	8-43



A



B

الشكل – 8 : اشكال كريات الدم الحمراء مصبغة بصبغة اللشمان (X1000) .
ظهور عدم تصبغ الكريات الدم الحمراء و اشكالها غير المنتظمة .
A : لمجاميع الفئران المحقونه بمعقد اللابيوسوم / v- abl .
B : لمجاميع الفئران المحقونه بمعقد مستحلب صفار البيض / v-abl .

المصادر:

1 - Aral, C. and Abuga, J., 2003. *Preparation and in vitro transfection efficiency of chitosan micro spheres containing plasmid DNA : poly(L-lysine) complexes* . J. Pharm Pharmaceut Sci. 6: 321- 326.

2 - Peart , V. , and Dujraden , N.2001 . *Topical delivery of nucleic acid in the skin* . J. Pharma Sciences . 11:57-68 .

3 - Burcine , M.M. , Schiedner , G. , Kochanek , S. , Tsai , S.Y. , and O malley , B.W. 1999. *Adenovirus – mediated regulated target gene expression in vivo* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 96: 355-360.

4 - Prince , H.M. , 1998. *Gene transfer :A review of method and application* . Pathology. 30: 335-347.

5- Smith , A.E.1995 .*Viral Vector in Gene Therapy.*Annu. Rev. Microbiol. 49 : 807 – 838 .

6- Escriou , V. , Ciblina , C. , Helbling-Leclerc , A. , Wils , P. , and Scherman , D. (1998) . *Cationic Lipid – mediated gene transfer : Analysis of Cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA* .Cell. Bio. Toxic . 14: 95-104 .

7- Nabel , G.J. , Nabel , E.G. ,Yang , Z. , Fox , B.A. , Plautz , G.E. , Gao , X. , Huang , L. , Shu , S. , Gordon , D. and Chang , A.E. , 1993 . *Direct gene transfer with DNA – Liposome complexes in melanoma : expression , biological activity , and lake of toxicity in humans* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 90:11307-11311.

8- Felgner , J.A. and Ringold , G.M. 1989. *Cationic liposome – mediated transfection* . Nature . 337: 387-388

9- Wheeler , C.J. , Felgner , P.L. , Tasi , Y.J. , Marshal , J. , Sukhu , L. , Doh , S.G. , Hartikka , J. , Nietupski , J. , Smith , A. and Cheng , S.H. 1996 . *A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse Lung* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 11454-11459 .

10 - Ono , T. , Fujino , Y. , Tsuchiya , T. and Tsuda , M. 1990 . *Plasmid DNAs directly injected into mouse brain with lipofection can be incorporation and expressed by brain cells* . Neuvosci . Lett. 117 : 259-263 .

11 - Schenborn , P.J. 1995 . *TFX^{Tm} - 50 reagent : a new transfection reagent for eukaryotic cells.* Promega Notes 25 : 2-7.

12 - Miyazaki , J. 2002 . *Basic components of gene expression plasmid* . Pharm. Res. 1:1-14 .

13 - Yew , N.S. , Zhao , H. , Przybylska , M. , Tousignant , J.D. , Scheule , R.K. , Cheng , S.H. , 2002 . *Liposome – DNA complexes related to DNA release and delivery* . J. Science . 281(5373): 78-81.

14 - Stadelman , W.I. and Cotteril , J.O. 1986. *Egg Science and Technology* .__Third Ed. AVI Publishing Company . Inc . Westport.

15 - Goff , S. P. , 1980 . *Regestration form* . Cell . 22 : 785

16-Sambrook , J. , Fritsch , E.F. and Maniaties , T. 1989 . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd .

Cold Spring Harbor Laboratory Press . Cold spring Harbor . New York .

17 - الدسوقي ، فاروق . 1972 . دليل التلقيح الاصطناعي . وزارة الزراعه ، مديرية الثروه الحيوانيه العامه ، قسم التلقيح الاصطناعي

18 - Harrivan, M. S. and MtCance, M. E. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.* Academic. Press. Inc. London.

19 - السامرائي ، أحمد عبد الستار 2003 . تحضير بعض مشتقات القواعد النايتروجينيه المتأصره مع الفلزات و دراسة فعاليتها الحيوية . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة الموصل

20 - Allen , J.W. and Latt , S.A. 1977 . *Analysis of SCE formation in vivo in mouse spermatogonial as new test system for environmental mutagens.* Cytogenetic Cell Genet. 18:231 – 337 .

21- Good , L. 1987 . *Use of liposome to encapsulation sources of iron.*B.Sc. Thesis . Dep. Food Sci. Faculty Agr. University of British Columbiana.

22- Rowland , R.N. and Woodley , J.F. 1980 . *The stability of liposome in vitro to PH , bile salts and pancreatic lipase* . Biochem. Biophs. Acta. 620 : 400-409 .

23 - Bigey , P. , Burean , M.F. and Scherman , D.2002 . *In Vivo plasmid DNA electro transfer* . Curr. Opin. Biotechnology 13 : 443-447 .

24 – البلداوي ، عامره محمد .2001 . تحضير الهيم من دم الابقار و الاغنام و توسيمه بالتنكشيوم – 99 م لدراسة توافره الحيوي . رسالة دكتوراه – قسم الصناعات الغذائيه كلية الزراعه / جامعة بغداد .

25- Clark , W. and Christopher , K. 2001 . *An introduction to DNA : Spectrophotometer , degradation and the ' Franken gel ' experiment.* Tested Studies for Laboratory teaching . 22 : 81-99 .

26 - Friend , D.S. , Papahadjopoulos , D. and Debs , R.J., 1996. *Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes* . Biophs. Actu. 1278 : 41-50 .

27 - Lechardeur , D. and Lukacs , G. 2002. *Cellular Uptake , metabolic stability and nuclear translocation of nucleic acids* . Pharma. Res. 11: 211-225 .

28 - Teffel , A. 2001 . *Primary Hematology* . 10th Ed. Chapter 12 : 134 , Chapter 14 : 193 .

29 - Web . MD. University 2001 . *Intel health , ediss , 60 – blood and immunity leukemia over view* .Web. MD. University , Student Lounge Web MD / Lycos .

30 - Mughal , Tariq and Goldman , John . 1999 . *Understanding Leukemia and Related Cancer's* . Black Well Science , UK .

31 -Kurzrock , R. , Guttermanm , J.U. and Talpaz , M. 1988. *The molecular genetic of Philadelphia chromosome positive leukemias* .N.Engl. J. Med. 319 : 990-998 .

32 - Groffen , J. , Voncken , J.W. , Van Schaick , H. and Heisterkamp , N. 1992 . *Animal models for chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia.* (suppl.1) 6: 44-46 .

The Direct Gene Injection Using of Egg Yolk Emulsion as Carrier and its Comparison with Liposomes.

*Ali Abdul Rahman Al-Za'ag** *Hadeel W. Almashhadanee***

*Baghdad University/Institute of Genetic engineering and Biotechnology.
** Baghdad University/College of science Biotechnology Dept.

Abstract:

The efficiency of egg yolk emulsion in coating DNA and its delivery across cellular membranes was evaluated in comparison with liposomes DOPE . The murine leukemia viral oncogene v-abl , cloned on pBR322 was used as a DNA substrate for direct injection into mice tissue .

the DNA complexes were prepared by mixing the DNA with egg yolk emulsion and liposome . Each was directly injected into mice peritoneal cavity with proper control.

The gene delivery was examined phenotypically by blood analysis and cytogenetic analysis . Chromosomal changes were detected in the bone marrow as from the fourth day post inoculation through the eleventh day when chromosomal ring s could be seen . this was accompanied by decrease in the WBC count , an increase in lymphoblast cells size and percentage and the discoloration of irregular RBCs . these are typical signs of acute lymphatic leukemia .

Anatomical examination have indicated 25% increase in the spleen mplemented using specific primers to confirm the integration of the delivered DNA into the genomic content of the mice tissue within 48 hr post inoculation .