

الحقن المباشر للجينات باستخدام مستحلب صفار البيض كمادة ناقلة ومقارنته بمادة اللايوسوم الصناعية

علي عبد الرحمن الزعك*

هديل وليد المشهداني**

تاريخ قبول النشر 2010/ 3/ 1

الخلاصة

درست كفاءة مستحلب صفار البيض في تغليف الدنا لنقله عبر الأغشية الخلوية والتعبير عنه مقارنة بمادة اللايوسوم الصناعية 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 اللايوسوم مرة اخرى كنموذج سيطرة موجب ، ثم أجريت دراسه طيفيه على المعقدات المتكونه اذ لوحظ حصول تغيراً طيفياً لمعقد المستحلب مع البلازميد مقارنة بالمستحلب الحر. حقنت المعقدات في النسيج البريتوني (IP) للفئران المختبريه وحقنت مجموعة اخرى بالمحلول الداري المستخدم في تحضيرها كنموذج سيطرة سالب . كشف عن انتقال الجين و التعبير عنه جزئياً باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا و بوجود بوادي نوعيه تستهدف البلازميد pBR322 الحامل للجين المنقول و الذي اظهر اندماج جين v-abl في مجين الخلية المضيفة بعد مرور 48 ساعه من تاريخ الحقن و تحليل 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 حجمها بالاضافة الى ظهور كريات الدم الحمراء بأشكال غير طبيعيه فاقدته 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 ، اللايوسوم الصناعية DOPE

المقدمة :

انتاجها و تحضيرها ، لكنها تحتاج الى مواد تساعد على الانتقال عبر الأغشية الخلوية [6] تعتبر الجسيمات الدهنية الموجبة الشحنة من الانظمة الكفوه 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 الدهنية هي عبارة عن دهون فوسفاتية صناعية تحمل شحنة معاكسه لشحنة الدنا السالبة . (Cationic Lipid) عند درجة هذه الدهون في

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 العملية 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 ناقلاً 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 للاستجابة المناعية ، و يُعد انتاجها بتركيز عاليه من اهم العوائق في استخدامها [4 ، 5] الا ان النواقل اللافايروسيه تتميز بإمكانيتها على استيعاب حجوم كبيره من المادة الوراثيه و انخفاض كلفة

* معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد .

** قسم التقنيات الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد .

الماء ستكون حويصلات متعددة الطبقات (Multilamellar Vesicles) التي ترتبط مع الاحماض النووية مكونة معقداً مستقراً لتسهيل عملية دخولها الى الخلية من خلال آلية الالتهام (Endocytosis) .

[11، 12، 13]

تضمنت هذه الدراسة استخدام مستحلب صفار البيض (Egg Yolk Emulsion) عاملاً ناقلاً جديداً وطبيعياً للدنا و مقارنته بمادة اللابوسوم الصناعي من نوع DOPE في مجال الدراسة المتعلقة بتطوير العوامل الناقلة 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% وتعد البروتينات والدهون المكونين الرئيسيين للمواد الصلبة المتواجدة فيها مع كميات قليلة من الكربوهيدرات والمعادن . تبلغ نسبة الدهون فيه حوالي 32% - 35% . وتتألف الدهون الموجودة في صفار البيض من الكليسيريدات الثلاثية (Triacylglyceride) بنسبة 66% والدهون الفوسفاتية (Phospholipids) بنسبة 28% والكولسترول (cholesterol) 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) , TFXTM-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 (Na₂ EDTA) (Fluka) , Tris- base (HI-Media) , 6 – 8 Week old Balb/C mice (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 دارى Tris - Na₂EDTA (PH = 8) [16] .

- محلول سترات الصوديوم (PH = 7.4) . [17]
- محلول دارى سترات الصوديوم (PH = 8) .
- ماء خالي من الايونات . [18]

اذ حُضِرَت المستحلبات و قيست استقراريتها وفق ما جاء في كلاً من الدسوقي [17] و

[18] حيث استخدم محلول دارى سترات

Horrihan & MtCance الصوديوم

في تغليف الدنا لأنه أكثر المحاليل استقراراً .

2 – تغليف الدنا بكلاً من مستحلب صفار البيض ومادة اللابوسوم كنموذج سيطرة

موجب :

(النقاوة 1.8) مع مستحلب صفار البيض بنسبة

مزج الدنا البلازميدي 1:1p-v-abl و

مع مادة اللابوسوم بنسبة 4:1 ثم لوحظت المعقدات المتكونة تحت المجهر .

3 – أجراء قياسات طيفيه للمعقد مستحلب

صفار البيض مع الدنا :

اجريت عملية مسح Scaning بجهاز المطياف

الضوئي للأشعة فوق البنفسجية من 200 نانوميتر

الى 600 نانوميتر للمعقد المتكون و المستحلب

الحر لمقارنة النتائج مع التغيرات التي يمكن ان

تحدث في حالة تكون مركب جديد . [19]

4 – حقن المعقدات في الفئران المختبرية :

قسمت 24 فأرة نوع Balb/C اعمارها 8 – 10

أسابيع الى ثلاثة مجاميع ثمانية فأرات لكل مجموعة

حققت مجموعتين منها بكمية (100) مايكروليتر

من كل من معقد مستحلب صفار البيض مع الدنا (

المجموعة الاولى) و معقد اللابوسوم مع الدنا (

المجموعة الثانية) كنموذج سيطرة موجب تحت

الغشاء البيريتوني (IP) للفأر (بين البطن والفخذ

الايسر) بعد تعقيم المنطقة بالكحول الايثيلي (70%)

كما و حققت المجموعة الثالثة من الفئران بنفس

الكمية من المحلول الدارى المستخدم في تحضير

هذه المعقدات كنموذج سيطره سالب .

5 – جمع العينات و أجراء الفحوصات

اللازمه :

جمعت عينات الدم خلال فترات زمنية 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

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 المناقشة :

نظراً 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 مدة من الزمن، فحسنت استقرارية المستحلب باستخدام اربعة محاليل مائيه في تحضيره ، فقد ظهر ان المستحلب المحضر من محلول دارئ سترات الصوديوم اكثر المستحلبات استقراراً 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 ثباتاً [17] كما ان المحلول الذي حضر منه المستحلب ذو الرقم الهيدروجيني (8) أثر على حجم السائل المحجوز داخل اللابوسومات المتكوّنه في هذا المستحلب [21] حيث ان للرقم الهيدروجيني أهميه في زيادة استقرارية التغليف عن طريق التاصر الهيدروجيني بين الفوسفوليبيدات الموجبة الشحنة و الدنا ذي الشحنة السالبة المحجوز في رقم هيدروجيني قاعدي [22] . نظراً للزوجة المستحلب فقد تم تخفيفه بمزجه مع دنا البلازميدي بنسبة 1:1 و ذلك للتقليل من لزوجه و من ثمّ تزداد كفاءته في الانتقال عبر الاغشية الخلوية و سهولة تحلله داخل السابتوبلازم لتحرير البلازميد و انتقاله الى النواة [23] .

أستخدم المجهر لرؤية شكل المعقد المتكوّن من الدنا مع مستحلب صفار البيض ومقارنته بمعقد اللابوسوم الذي يظهر بشكل حويصلات منتفخة دائرية شكل 2 - في حين ظهر شكل التغليف للمستحلب بهيئة حويصلات بيضويه منتفخة شكل 3 - دلالة على نجاح عملية التغليف بتكوّن بعض اللابوسومات داخل المستحلب واحتجازها للدنا اذ تختلف اللابوسومات المتكونة

أستخدم المجهر لرؤية شكل المعقد المتكوّن من الدنا مع مستحلب صفار البيض ومقارنته بمعقد اللابوسوم الذي يظهر بشكل حويصلات منتفخة دائرية شكل 2 - في حين ظهر شكل التغليف للمستحلب بهيئة حويصلات بيضويه منتفخة شكل 3 - دلالة على نجاح عملية التغليف بتكوّن بعض اللابوسومات داخل المستحلب واحتجازها للدنا اذ تختلف اللابوسومات المتكونة

أستخدم المجهر لرؤية شكل المعقد المتكوّن من الدنا مع مستحلب صفار البيض ومقارنته بمعقد اللابوسوم الذي يظهر بشكل حويصلات منتفخة دائرية شكل 2 - في حين ظهر شكل التغليف للمستحلب بهيئة حويصلات بيضويه منتفخة شكل 3 - دلالة على نجاح عملية التغليف بتكوّن بعض اللابوسومات داخل المستحلب واحتجازها للدنا اذ تختلف اللابوسومات المتكونة

الفحوص المتعلقة بالدم و لغرض استخلاص الدنا منه [16] ، بعدها تشريح الفأر وأخذت عينة من النخاع العظمي من عظمة الفخذ والساق ليتم دراستها على مستوى الوراثة الخلوية [20] .

6 - التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا :

استخدمت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) Polymerase Chain Reaction لسلسلة الدنا البلازميدي المراد نقله باستخدام بواذئ نوعيه متخصصة لتتابع جين التتراسايكلين 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 .

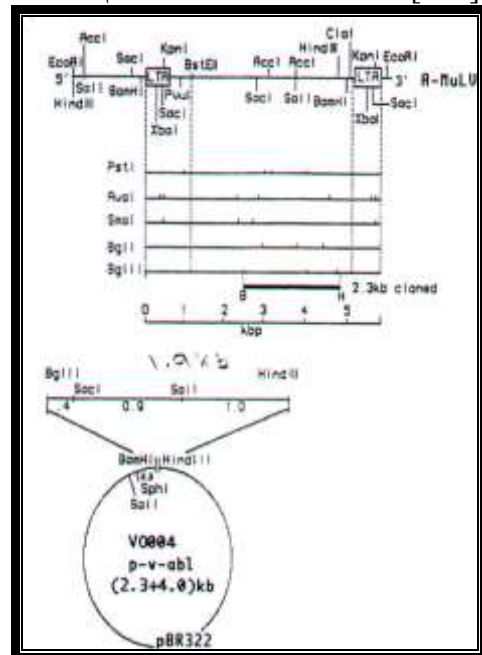
طبق البرنامج الذي يتضمن دوره واحده عند درجة حراره (95) مئوية مدة (2) دقيقه لفك ارتباط شريطي الدنا القالب ، تبعه (32) دوره تضمنت كل منها ثلاث مراحل : أولها لإعادة مسخ الدنا في كل دوره و كانت درجة الحرارة (94) مئوية مدة (60) ثانيه ، ثم مرحله ثانيه والتي تسمح بتهجين البادئ بالتسلسل المكمل له و ذلك عند درجة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

وفق ما جاء به Allen & Latt

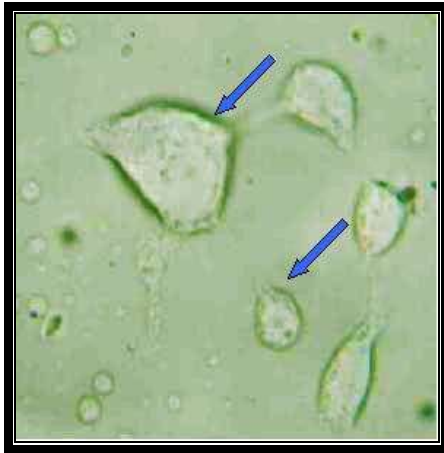
[20] ، كما و اجريت فحوصات للدم .



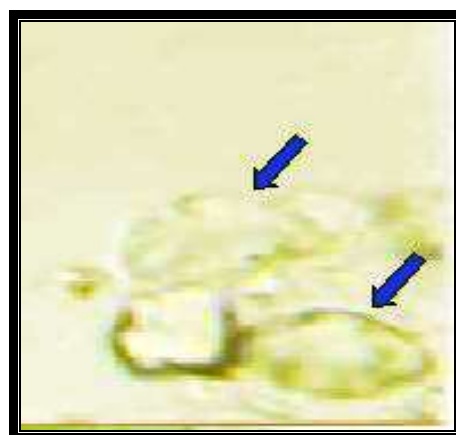
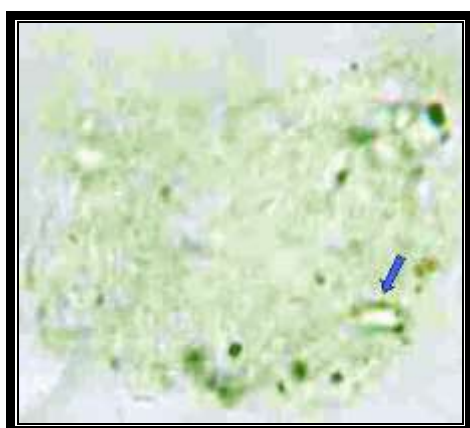
الدنا المستخلصه من دم الحيوان بعد عملية حقن المعقدات، حيث اظهرت النتائج اندماج جين v-abl في مجين الخلية المضيفة بعد مرور 48 ساعة من تاريخ الحقن و تحلل البلازميد الحامل له اذ لم يحصل تضخيم لجين المقاومه للنتراسايكلين للبلازميد الحامل للجين المنقول شكل - 6 . هذا يشير الى نجاح عملية الانتقال كما ظهر فيما بعد في نتائج فحوص الوراثة الخلوية و فحص الدم بعد مرور 4 الى 10 ايام من تاريخ الحقن ، فنظراً لتركيبة جزيئي اللايوسوم 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) بالآلية الالتقام (Endocytosis) [26] ففي عملية الانتقال هذه يهدم غشاء الجسيم الداخلي ويحرر الدنا الى الساييتوبلازم نتيجة لاختلاف الضغط التناضحي بين داخل الجسيم الداخلي (خواص المحلول الدائري 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]

ظهور ثلاث قمم لذروة الامتصاص لنموذج المعقد : الاول بطول موجي (255.5) نانوميتر العائده لامتصاص حلقة البيورين Purine ، اذ ان البيورينات و البريميدينات هي الوحدات التي تمتص الاشعه فوق البنفسجية في الحوامض النوويه و مشتقاتها ، اما فضلات السكر فتكون شفاهه فوق (200) نانوميتر، وهذا يعني ان الدنا قد حافظ على تركيبه الكيميائي . اما القمتين الاخرين فهما قريبتان من بعضهما من حيث الاطوال الموجية وهي عائده لنموذج المعقد المتكون فهي قمم ذروة امتصاص جديده بالمقارنه مع قمم ذروة الامتصاص لنموذج مستحلب صفار البيض الحر هذا قد اعطى انزياح للقمم عن موقعها الاصلي للمستحلب الحر مما يشير الى تكون مركب جديد بتأصرات جديدة بين الدنا و المستحلب . [25]

استخدمت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) للكشف عن انتقال البلازميد الحاوي على جين v-abl و اندماجه في مجين الخلايا باستخدام بواقي نوعيه متخصصة لتتابع جين النتراسايكلين للبلازميد pBR322 (الحامل للجين) و بعد تثبيت الظروف المثلى لتضاعف هذا الجزء من البلازميد قبل حقنه شكل - 5 طبق البرنامج نفسه على نماذج



الشكل - 2 : اللايوسوم (DOPE) بعد تغليفه للدنا تحت المجهر (X1000)

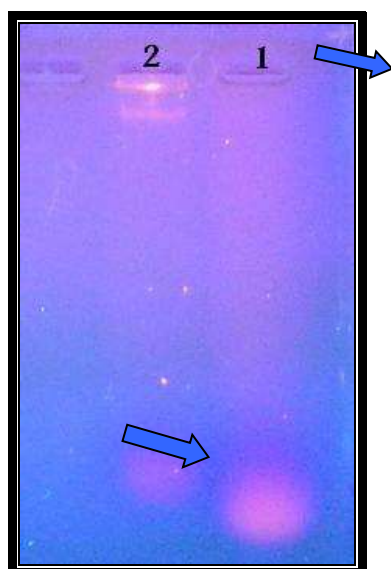


الشكل - 3 : مستحلب صفار البيض بعد تغليفه للدنا تحت المجهر (X1000)

B - الرسم البياني لمعقد مستحلب صفار البيض / v-abl ظهور قمتين متقاربتين في الأطوال الموجية (355.5) و (350.5) نانومتر وإزاحة القمة الأصلية إلى طول موجي (255.5) نانومتر مع ملاحظة تغير الامتصاصية عند الطول الموجي 600 نانومتر .

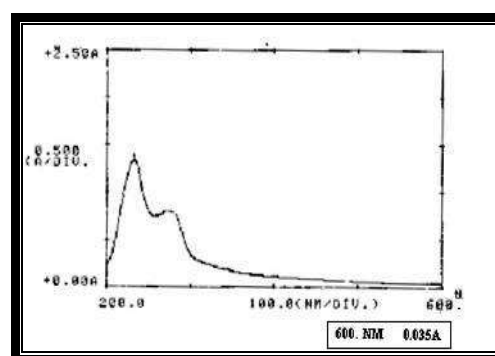
جدول 1 : قيم الأطوال الموجية لقمم ذروة الامتصاص لنموذج المستحلب الحر و معقده مع الدنا .

النموذج	قيمة الطول الموجي لذروة الامتصاص (نانومتر)	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

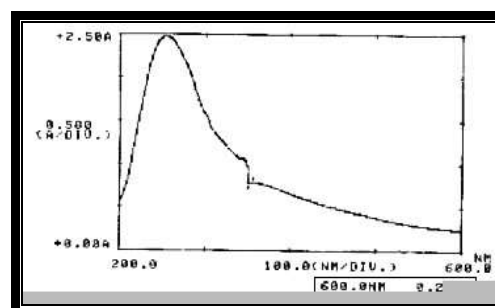


الشكل - 5 : ناتج تضخيم الجين المقاوم للنتراسايكلين للبلازميد pBR322 الحامل لجين MuLV - A قبل عملية الحقن

المسار (1) ناتج التضخيم .
المسار (2) البلازميد v-abl قبل عملية الحقن .



A



B

شكل - 4 : امتصاصية النماذج المستخدمة (X = الامتصاصية ، Y = الطول الموجي) :
A - الرسم البياني لمستحلب صفار البيض الحر ظهور قمة واحدة في طول موجي 232 نانومتر

الدم الحمراء فلو حظ 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) لتراحم خلايا الدم الطبيعيه و تتجمع في العقد اللمفيه مما يؤدي الى تورمها [28] .

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



الشكل - 6 : الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل التضاعفي باستخدام بوائى نوعية لجين المقاومه للنتراسايكلين 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 عدديه لكروموسومات الخلايا في طور ال Metaphase في اليوم الرابع من تاريخ الحقن فكانت نسبة الخلايا التي عانت من تغير في اعدادها الكروموسوميه الى الخلايا الطبيعيه حوالي 50% لمعقدات اللابوسوم و مستحلب صفار البيض مع البلازميد في حين لم يحصل اي تغير وراثي لخلايا نخاع العظم للمجاميع المحقونه بالمحلول الدائري 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 صورته كامله للدم وفحص تحت المجهر بعد عشرة ايام من الحقن لتشخيص نوع سرطان الدم الناتج من نقل v-abl فلو حظ زياده في الخلايا اللمفيه بنسبه عاليه مقارنة بنسبتها الطبيعيه في الدم لكلا المجموعتين و زيادة غير طبيعيه في حجمها ، بالاضافه لنقصان في عدد كريات الدم البيضاء لتراكمها في الكبد و الطحال والعقد اللمفيه (Lymph Node) (جدول - 3) . اما كريات

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

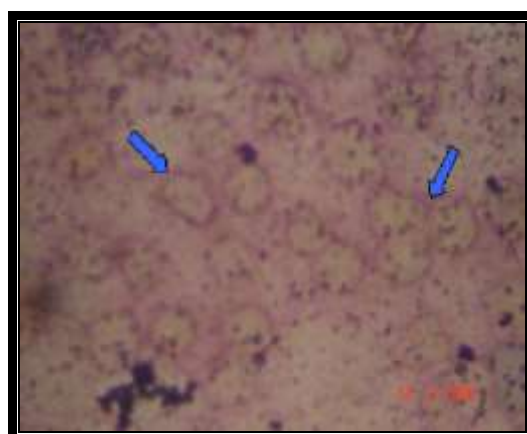
نوع المادة المحقونة	نسبة العامل الناقل للبلازميد	الفترة الزمنية بعد تاريخ الحقن (بالايام)	نسبة الخلايا التي تعاني تغيرا في الاعداد الكروموسومية
معقد اللابوسوم / الدنا	1:4	(4)	55%
		(11)	83%
		(18)	92%
		(22)	هلاک
معقد مستحلب صفار البيض / الدنا	1:1	(4)	50%
		(11)	82%
		(18)	90%
		(22)	هلاک
محلول رقم (9)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

المصادر:

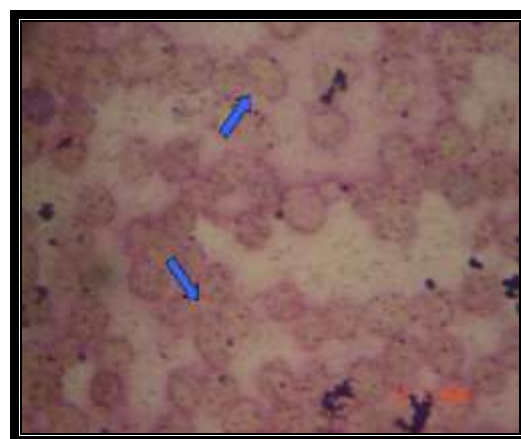
- 1 - Aral, C. and Abuga, J., 2003. *Preparation and in vitro transfection efficiency of chitosan micro spheres containing plasmid DNA : poly(L-lysine) complexes* . J. Pharmaceut Sci. 6: 321- 326.
- 2 - Peart, V. , and Dujraden , N.2001 . *Topical delivery of nucleic acid in the skin* . J. Pharma Sciences . 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*

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

نوع المعاملة للمجموعة المحقونة	عدد كريات الدم البيضاء (X1000/ml)	عدد كريات الدم البيضاء الطبيعية (X1000/ml)	نسبة الخلايا اللمفية الطبيعية (%)	نسبة الخلايا اللمفية (%)
معقد الالايوسوم	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 المحقونة بمعقد الالايوسوم / v-
abl .
B : لمجاميع الفئران المحقونة بمعقد مستحلب صفار البيض / v-abl .

- to PH , bile salts and pancreatic lipase . Biochem. Biophys. Acta. 620 : 400-409 .
- 23 - Bigey , P. , Bureau , M.F. and Scherman , D. 2002 . *In Vivo plasmid DNA electro transfer* . Curr. Opin. Biotechnology 13 : 443-447 .
- 24 - البلداوي ، عامر محمد . 2001 . تحضير الهيم من دم الابقار و الاغنام و توسيمه بالتتكشيوم – 99 م لدراسة توافره الحيوي . رسالة دكتوراه – قسم الصناعات الغذائية كلية الزراعة / 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* . Biophys. Acta. 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 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 . *TFXTM - 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 الزراعة ، مديرية الثروة الحيوانية العامة ، 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 النايتروجينية المتأصرة 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*

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 .