

**Review article****Genomic editing technology by CRISPR/CAS in producing transgenic chickens**

Masoomeh Zare ^{1*}, Mahdi Nosratjou ², Abbas Safari ¹, Misagh Moridi ¹

¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran

²Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

Key Words

Transgenic chickens
Genome editing
CRISPR /Cas9
Endonuclease

Abstract

Birds species especially broilers, in addition to being one of the most important species of animal protein suppliers, are considered as a model in developmental biology, medicine and biomedicine. Recently, precise genome editing technologies have been rapidly developed through the CRISPR /Cas9 system which they are one of the most promising options for genome editing. The basis of the process hidden in the function of engineered endonucleases and has led to the production of transgenic chickens for vaccine, recombinant proteins and monoclonal antibodies. In particular, these techniques are cultured with primary germ cells and combined with viral vector systems to produce a valuable bird model edited by the genome for a variety of purposes. In this study, we described recent advances in CRISPR / Cas9-based genome editing technology and its applications in bird species.

* Corresponding Author's email: zare.masum@gmail.com

Received: 2 August 2021; Reviewed: 6 September 2021; Revised: 7 November 2021; Accepted: 8 December 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.292099.2568](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.292099.2568)

مقاله مروری

تکنولوژی ویرایش ژنومی به واسطه CRISPR/CAS در تولید جوجه ترایخت

معصومه زارع^{۱*}، مهدی نصرت جو^۲، عباس صفری^۱، میثاق مریدی^۱^۱ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران^۲ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

گونه‌های پرندگان از جمله مرغ با نام علمی *Gallus gallus* علاوه بر این که یکی از مهم‌ترین گونه‌های تأمین‌کننده پروتئین حیوانی می‌باشند، به عنوان یک گونه مدل در زیست‌شناسی تکوینی و پزشکی و زیست پزشکی به شمار می‌روند. اخیراً، فن‌آوری‌های دقیق ویرایش ژنوم با واسطه سیستم CRISPR/Cas9 به سرعت توسعه یافته و یکی از گزینه‌های مناسب و امیدوارکننده برای ویرایش ژنوم به حساب می‌آیند. اساس این فرایند در عملکرد اندونوکلئازهای مهندسی شده نهفته است و منجر به تولید جوجه‌های ترایخت برای ساخت واکسن، پروتئین‌های نو ترکیب و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال شده است. به‌طور ویژه، این تکنیک‌ها با سلول‌های بنیادی کشت شده و با سیستم‌های ناقل ویروسی ترکیب شده‌اند تا یک مدل پرنده با ارزش ویرایش شده توسط ژنوم را برای اهداف مختلف تولید کنند. در این پژوهش، با هدف معرفی تکنیک‌های اخیر ویرایش ژنومی در پرندگان، پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR/Cas9 و کاربردهای آن در گونه‌های پرندگان توصیف گردید.

جوجه ترایخت
ویرایش ژنوم
CRISPR / Cas9
اندونوکلئاز

مقدمه

انتقال ژن به منظور افزودن اطلاعات ژنتیکی خارجی به ژنوم یک موجود زنده، سرکوب کردن یک ژن داخلی و جایگزین کردن یک ژن با یک ژن کاربردی که ممکن است جهش یافته همان ژن و یا یک ژن کاملاً متفاوت با ژن بومی باشد؛ انجام می‌گیرد. انتقال ژن در حیطه زیست‌فناوری قرار می‌گیرد که از سامانه‌های زنده گوناگون به منظور تولید پروتئین‌ها و داروهای نو ترکیب، مطالعه ساز و کار ژن‌های عملکردی و بیماری‌های انسانی و غیره استفاده می‌کند. اخیراً جوجه مرغ به دلیل وجود میزان بالای پروتئین در تخم مرغ، شباهت زیاد الگوی گلیکوزیله شدن پروتئین‌های موجود در تخم مرغ به پروتئین‌های انسانی و ثبات زیستی پروتئین خارجی و فاصله نسل کوتاه در مقایسه با دیگر میزبان‌ها از جمله گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و پستانداران تراریخت، به عنوان یک راکتور زیستی مناسب در زیست‌فناوری مورد توجه قرار گرفته است (۱). با این وجود، برای به کارگیری جوجه به عنوان یک راکتور زیستی مناسب در زیست‌فناوری ابتدا باید به تکنولوژی ویرایش ژنومی برای تولید پرندگان تراریخت دسترسی پیدا کرد. به گونه‌ای که این تکنولوژی، علاوه بر درک عملکرد ژن‌های موجود در آن، توانایی ویرایش این توالی‌ها با استفاده از حذف و یا تغییر واریانت‌های سببی این ژن‌ها، و در نهایت بررسی عملکرد فنوتیپ‌های حاصل از آن را داشته باشد. لزوماً چنین پیشرفت‌هایی نیازمند ابزارها و فناوری‌های جدیدی است که توانایی ویرایش هدفمند ژنوم را داشته باشد و آلل‌های موثر بر بروز صفات را ویرایش و یا ارتقاء دهد. بدین منظور از ابتدا تاکنون تکنولوژی‌های مختلفی برای تولید پرندگان تراریخت ابداع شده است که با استفاده از سیستم‌های تحویل ژن (ناقلین ویروسی و غیرو ویروسی) به سلول هدف منتقل می‌شوند. به طور کلی دو روش مستقیم و غیر مستقیم برای تولید پرندگان تراریخت وجود دارد که در روش مستقیم جنین با استفاده از DNA و یا حامل‌های ویروسی دستکاری می‌شود و در روش‌های غیرمستقیم بر پایه سلولی برای تولید پرندگان تراریخت استفاده می‌کنند (۳). در روش غیرمستقیم که براساس انتقال ژن بر پایه سلولی است، ابتدا ژن هدف با استفاده از سیستم‌های تحویل ژن، درون ژنوم قرار می‌گیرد و اجازه تولید پرندگان تراریخت با اهداف تولیدی مختلفی را می‌دهد. هم‌چنین، در این روش پژوهشگر توانایی آزمایش بیان ژن انتقال یافته را قبل از انتقال سلول‌ها به رویان را دارد (۳). این تکنولوژی‌ها به دلایلی همانند تکوین منحصر به فرد جوجه نسبت به دیگر گونه‌ها پیشرفت اندکی را حاصل کرده بودند تا این که اخیراً تکنولوژی‌های ویرایش ژنومی از جمله سیستم ویرایش ژنوم وابسته به نوکلئاز انگشت روی (ZFN: Zinc-finger nucleases) و اندونوکلئاز فعال کننده رونویسی (TALEN: Transcription activator-like effector

nucleases) و خوشه تکرارهای کوتاه پالیندرومیک پخش شده بین فواصل منظم وابسته به پروتئین Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) توسعه یافته و راندمان انتقال و میزان بیان را بهبود بخشیدند. در این روش‌ها استدلال بر این است که می‌توان از فرایند عمومی بسیار محافظت شده نو ترکیبی همولوگ (HR: Homologous Recombination) استفاده کرد. به طور کلی، سلول‌ها از فرایند نو ترکیبی همولوگ جهت ایجاد نو ترکیبی در جایگاه خاصی از ژنوم به ویژه همراه با فرایند اتصال انتهای غیر همولوگ (Non Homologous End Joining) جهت ترمیم DNA دارای دو رشته شکسته شده (Double-Strand Break) استفاده می‌کنند (۴، ۵). نتایج تکنولوژی‌های ویرایش ژنومی اخیر منجر به تولید پروتئین‌های نو ترکیب مختلفی مانند آنتی‌بادی‌ها (از جمله آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی) (۶، ۷، ۸)، آنزیم‌ها (باکتری β بتالاکتاماز) (۹)، اینترفرون (۱۰) در تخم مرغ گردید. در این بین، اغلب این مطالعات، سیستم CRISPR/Cas9 را کامل‌ترین تکنولوژی‌های ویرایش ژنومی برای تولید پرندگان تراریخت معرفی کرده‌اند. در یکی از این مطالعات تکنیک CRISPR/Cas9 منجر به جهش حذفی در لوکوس OVA در سلول‌های زایای بدوی جوجه گردیده است و جوجه‌های کایمر با ژنوتیپ هتروزیگوت تولید شده‌اند (۱۱). در واقع، سیستم CRISPR/Cas9، تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله دار منظم خوشه‌ای نامیده می‌شود که بخشی از DNA پروکاریوت با تناوب‌های کوتاه توالی‌های بنیادین هستند. این سیستم نوعی سیستم ایمنی تطابق پذیر در باکتری‌ها به شمار می‌رود که آن‌ها را قادر به کشف DNA ویروسی و متعاقباً تخریب آن می‌کند. بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام Cas9 است، که توانایی جستجو، برش زدن و سرانجام تخریب DNA ویروس را دارد (۱۲، ۱۳، ۱۴). بنابراین در این مقاله مروری به عملکرد تکنولوژی ویرایش ژنومی به واسطه CRISPR/CAS و کاربرد آن در تولید جوجه تراریخت برای بهبود و افزایش پیشرفت ژنتیکی در پرندگان و اصلاح نژاد آن‌ها پرداخته می‌شود.

تاریخچه تولید جوجه تراریخت: تغییرات ژنتیکی مرغ به مراتب نسبت به دیگر موجودات به دلیل مشکل دسترسی یا زیگوت پیشرفت اندکی داشته است. پژوهشگران در ابتدای تحقیقات روی تولید پرندگان تراریخته از روش‌های مرسوم انتقال ژن در پستانداران مانند تزریق DNA به پیش‌هسته تخم، استفاده کردند (۱۵، ۱۶). در سال ۱۹۸۸ یک سیستم کشت *in vitro* از جنین تخم بارور برای دسترسی بهتر به جنین جوجه برای اصلاح ژنتیکی توسعه داده شد (۱۷). این روش به دلیل معایب زیاد از جمله هزینه بالای این روش، نیاز به ذبح پرنده برای دستیابی به سلول تخم و عدم تعداد مناسب سلول تخم موفقیت آمیز نبود (۳). چند سال بعد گروه Helen Sang's، اولین لاین جنسی مرغ تراریخت از طریق میکرواینجکشن براساس سیستم کشت پوسته

جایگزین روش Perry توسعه دادند، اما فرکانس انتقال لاین جنسی پایین بود (۱۵، ۱۷، ۱۸). سپس پژوهشگران پیشنهاد کردند که مرحله x رویانی به دلیل تعداد زیادی سلول با مورفولوژی تمایز نیافته، بهترین مرحله برای تولید جوجه‌های تراریخت محسوب می‌شود (۱۹). به گونه‌ای که محققان با استفاده از دستکاری سلول‌های مرحله بلاستودرم (مرحله x) تخم تازه بارور شده موفق به تولید پرندگان تراریخت شدند. همچنین استفاده از وکتور ویروسی با توانایی تولید پرندگان کایمر تراریخته عنوان شد، اما فراوانی انتقال ژن هنوز (۰/۷ تا ۰/۹) پایین بود (۹، ۲۰). در نهایت روش‌های غیرمستقیم، به واسطه کشت و انتقال ژن به سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) سلول‌های زایای بدوی (PGCs) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (SSCs) نیز در مقالات گزارش شده است (۲۱). در این بین، PGCs نسبت به دیگر سلول‌های بنیادی پرندگان توانایی حفظ ویژگی انتقال اطلاعات ژنتیکی به نتاج و قابلیت دستکاری ژنتیکی و راندمان بالای تولید کایمر را دارا است (۱۸)، بنابراین در دهه‌های اخیر محققان برای اصلاح ژنوم مرغ روی سلول‌های PGCs متمرکز شدند. بدین گونه که، اولین گزارش در مورد تولید جوجه‌های کایمر از طریق انتقال ژن به PGCs کشت داده شده توسط Van de Lavoie و همکاران گزارش شد (۲۲). آن‌ها ژن *GFP* را به PGCs انتقال دادند و پس از انتخاب PGCs ترانس ژن شده، آن‌ها را به جنین پذیرنده انتقال دادند و پرندگان تراریخت حاصله توانایی تولید نتاج مثبت به *GFP* را داشتند. اما راندمان وارد شدن ژن *GFP* به PGCs کشت داده شده، پایین بود و بیان ژن *GFP* در اثر خاموش شدن ژن نیز سرکوب و کاهش پیدا کرد (۲۲). در ادامه این مشکل با استفاده از روش‌های نوین تر انتقال ژن که استفاده از وکتورهای لنتی ویروس (۲۳، ۲۴)، و کشت PGCs مرغی بود، بهبود یافت و پرندگان بنیانگذار با راندمان انتقال ژن مناسب (۵۲/۲ درصد) به PGCs کشت شده، تولید شد. سپس با استفاده از روش‌های ترانسپوزن Tol2 و piggyBac، بیان *GFP* انتقال داده شده بدون اثرات خاموش شدن بهبود داده شد (۲۴). علاوه بر این، روش‌های دیگری بر پایه هدف قرار دادن ژن مورد نظر در ژنوم شامل ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 توسعه یافته‌اند که هم راندمان انتقال و هم میزان بیان را بهبود می‌بخشند (۲۴) که در ادامه بیش تر به آن‌ها پرداخته می‌شود.

سیستم‌های نوین تولید جوجه تراریخت

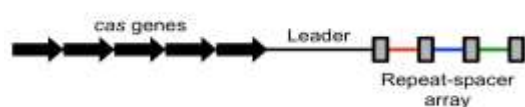
سیستم ترانسپوزون Tol2: برای تسهیل مطالعه عملکردی ژن‌های کلون شده در جنین مرغ، به عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه تکوین مهره‌داران، روشی برای وارد کردن DNA خارجی به جنین با الکتروپوراسیون توسعه داده شده است (۲۵). اگرچه این روش اجازه بیان خارج رحمی ژن معرفی شده در یک منطقه محدود

جنین را می‌دهد، اما بیان آن گذرا بود و بنابراین تجزیه و تحلیل به پدیده‌هایی محدود می‌شود که در مراحل اولیه رشد جنین رخ می‌دهند. برای حل این چالش، سیستم ترانسپوزون Tol2 برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در جوجه بررسی شد. این سیستم ابتدا از ژنوم ماهی مداکا (*Oryzias latipes*)، شناسایی شد و توالی آن مشابه ترانسپوزون‌های متعلق به خانواده *hAT*، یعنی *Ac* و *Tam3* است (۲۶)، گرچه ژنوم مهره‌داران حاوی تعداد زیادی توالی مربوط به ترانسپوزون‌های DNA، از جمله ترانسپوزون‌های خانواده *hAT* هستند، اما هیچ‌یک از آن‌ها به طور طبیعی فعال نیستند، اما عنصر Tol2 به صورت خودکار فعال می‌باشد (۲۷). عنصر Tol2 با طول حدود ۴/۷ کیلو باز (کیلو بایت)، حاوی ژن کدکننده پروتئین ترانسپوزاز است (۲۸). توالی mRNA رونویسی شده از ژن دارای ظرفیت سنتز پروتئینی به طول ۶۴۹ آمینو اسید است که منجر به انتقال یک ساختار Tol2 غیرمستقل می‌شود (۲۸). مکانیسم انتقال ژن به واسطه Tol2 بدین گونه است که به عنوان یک کپی واحد از طریق مکانیسم برش و چسباندن ادغام می‌شود و منجر به ایجاد یک کپی با توالی ۸ جفت باز در جایگاه هدف بدون تأثیر بر عملکرد ژنوم می‌شود. بنابراین، برای جلوگیری از این امر، توالی ۸ جفت بازی با تکرارهای مستقیم همیشه در مجاورت عناصر یکپارچه Tol2 گنجانده می‌شود (۲۹). برای استفاده از این سیستم در جوجه، یک DNA پلاسمیدی که حاوی یک ساختار Tol2 با کاست بیان *GFP* و یک پلاسمید کمکی حاوی ژن ترانسپوزاز تحت کنترل یک پروموتور CAGGS است (۳۰)، در جنین مرغ الکتروپوریت گردید. ساختار Tol2 بلافاصله پس از الکتروپوراسیون در ژنوم ادغام شد. در نتیجه *GFP* به طور پیوسته در سلول‌هایی که ساختار ژنوم را در بر گرفته‌اند، بیان شد و بیان *GFP* پایدار تا آخرین مراحل تکاملی مشاهده گردید (۳۱). همچنین انتقال کروموزومی Tol2 در مرغ با هیبریداسیون ساترن بلات تأیید شد (۳۱). ژن گزارشگر *GFP* نیز با استفاده از روش‌های ترانسپوزن Tol2 و piggyBac به PGCs جوجه بدون اثرات خاموش شدن انتقال داده شده و نتایج موفقیت آمیزی نسبت به روش‌های قبل، مشاهده شد (۲۴). علاوه بر این، روش انتقال ژن با واسطه Tol2 باید در مطالعه نقش ژن‌های دخیل در ارگانوژنز (*organogenesis*) مرغ مفید است. این روش با موفقیت برای بیان یک شکل منفی غالب از کادرین (*cadherin*) در سلول‌های افقی شبکیه و برای شناسایی نقش اساسی کادرین در مورفوژن دندریتیک استفاده شد (۳۲). اگرچه تولید جوجه و بلدرچین‌های تراریخته از اهمیت بالایی برای زیست‌شناسی تکاملی و برای اهداف دارویی برخوردار است، اما روش‌های تراریخته در گونه‌های پرندگان نسبت به سایر مهره‌داران مدل به خوبی اثبات نشده است (۳۳). سیستم ترانسپوزون

DDX4 روی کروموزوم جنسی Z در PGCs جوجه با یک جفت TALEN پرداخته شد و PGCs تراریخت برای تولید نتاج به جنین گیرنده منتقل شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که لوکوس *DDX4* از روی کروموزوم جنسی Z در نتاج نسل اول حذف شده و منجر به تولید مرغ‌های ناباور گردید (۲۳). هم‌چنین حذف ژنتیکی ژن اوالبومین به وسیله TALEN منجر به تولید جوجه‌های تراریخت بدون ژن اوالبومین شد (۳۸). از چالش‌های این سیستم‌ها می‌توان به پیچیدگی در جمع‌آوری و نگهداری آن‌ها در یک پلاسمید و کدگذاری آن‌ها در سلول‌های میزبان اشاره کرد، علاوه بر این تکرارهای پشت سرهم آن‌ها چالش بزرگی برای بسته‌بندی آن‌ها در وکتورهای ویروسی محسوب می‌شود که منجر به تلاش محققان برای یافت روش‌های مؤثرتر همانند CRISPR-Cas9 گردید (۲۳).

تکنولوژی ویرایش ژنوم به واسطه CRISPR-Cas9: تکنولوژی

ویرایش ژنوم به واسطه CRISPR-Cas از یک سیستم دفاعی تطبیقی در ۴۵ درصد از باکتری و ۸۴ درصد ارکی‌ها برای دفاع خودشان در برابر فاژها و پلاسمیدها الگو گرفته است و از آن برای ویرایش ژن‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود (۱۲، ۱۳، ۱۴). لوکوس CRISPR-Cas آرایه CRISPR و پروتئین‌های Cas تشکیل شده است که لوکوس CRISPR که در DNA کروموزوم و پلاسمید یافت می‌شود، از توالی‌های کوتاه تکراری که به وسیله توالی‌های منحصر به فرد جداکننده‌ها از همدیگر تفکیک شده‌اند، تشکیل شده است (۳۹) (شکل ۱). یکی دیگر از ویژگی‌های مرتبط با لوکوس CRISPR حضور یک توالی حفاظت شده، به نام قطعه رهبر، واقع در بالادست CRISPR با توجه به جهت رونویسی است (۴۰). در نهایت فعالیت CRISPR نیازمند حضور مجموعه‌ای از ژن‌های Cas هستند که در مجاورت CRISPR قرار دارند و برای کد کردن پروتئین‌های پاسخ ایمنی ضروری بوده و اغلب در تعامل با اسیدنوکلئیک همانند نوکلئازها، هلیکازها و پروتئین‌های متصل یافته با RNA نقش دارند (۴۱). پروتئین Cas دارای گروه بسیار متنوعی هستند که به سه گروه عمده I، II، III و همراه با چندین زیر گروه تقسیم‌بندی شده‌اند (۴۲). از مهم‌ترین آن‌ها، پروتئین Cas1 و Cas2 هستند که در مرحله انطباق درگیر هستند. دیگر پروتئین‌های Cas تنها با انواع خاصی از سیستم‌های CRISPR-Cas همراه هستند، به عنوان مثال Cas3 در سیستم نوع یک و Cas9 در سیستم نوع دوم و Cas10 در سیستم نوع سوم نقش برش توالی هدف را دارد.



شکل ۱: شماتیکی از لوکوس CRISPR/CAS

Tol2 ممکن است به ابزاری مفید برای تولید جوجه و بلدرچین‌های تراریخت پایدار تبدیل شود.

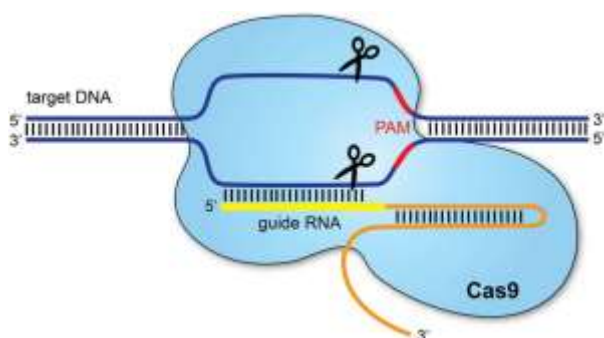
مهندسی ژنوم با استفاده از نوکلئازهای مهندسی شده:

نوکلئازهای مهندسی شده برای ویرایش ژنوم در چهار گروه مگانوکلئاز مهندسی شده (MegaN)، سیستم ویرایش ژنوم وابسته ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 دسته‌بندی می‌شوند. مگانوکلئاز اولین گروه از نوکلئازهای طبیعی هستند که توالی‌های وسیعی از DNA را شناسایی کرده و سپس به صورت اختصاصی برش می‌دهند. اما این سیستم در مهندسی ژنتیک با معایبی از جمله عدم پوشش کافی ژنوم، هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن ساخت آنزیم‌های مشخص برای توالی‌های مورد هدف مورد استقبال قرار نگرفت (۳۴). با این وجود، در دهه اخیر برای ویرایش هدفمند ژنوم چندین سیستم ویرایش ژنوم شامل ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 شناسایی و مورد بررسی قرار گرفت.

سیستم ویرایش ژنوم ZFN و TALEN: نوکلئازهای انگشت

روی، آنزیم‌های محدودکننده مصنوعی هستند که به وسیله ادغام دمین متصل به DNA انگشت روی با یک دمین برش‌دهنده DNA تولید می‌شوند (۵). نوکلئاز انگشت روی یک اندونوکلئاز جایگاه خاص است که برای اتصال و شکافتن DNA در موقعیت‌های خاص طراحی شده است. دارای دو دمین پروتئین شامل دمین متصل به DNA، که متشکل از عوامل رونویسی یوکاریوتی و انگشت روی است و دمین دوم یک دمین نوکلئاز، که متشکل از آنزیم‌های محدود کننده FOKI است و مسئول برش کاتالیزوری DNA است (۳۵). بنابراین پروتئین‌های مصنوعی هستند که با ادغام چندین دمین از رده فاکتورهای رونویسی تحت عنوان پروتئین‌های انگشت روی به یک دمین برش‌دهنده مستقل از توالی مربوط به اندونوکلئاز محدودکننده نوع IIS از FOKI ساخته شده‌اند. از آنجایی که نوکلئازهای انگشت روی با مشکلاتی مواجه بودند، در سال ۲۰۰۹ و با اعلام کشف وجود رابطه یک به یک بین نواحی تکراری TALEN و توالی DNA محل اتصال آن‌ها، امیدها برای شکل‌گیری ابزاری جدید برای هدف قرار دادن ژن‌ها در بین محققین فعال در زمینه مهندسی ژنوم شکل گرفت. این ابزار جدید، با استفاده از آنزیم‌های نوکلئازها منجر به ویرایش هدفمند ژنوم می‌شود و از قلمروهای شناسایی‌کننده DNA از باکتری بیماری‌زا گیاهی از جنس گزانتوموناس مشتق شده‌اند. مشابه با رده دوم با قلمرو کاتالیتیک FOKI ادغام می‌شود. یک TALEN، در حقیقت پروتئینی است که قادر به برش DNA در یک جایگاه خاص است و پس از ترمیم DNA در ناحیه برش خورده به تغییر در ژن مورد نظر منتج شود (۳۶، ۳۷). مطالعات اندکی با استفاده از این سیستم‌ها روی پرندگان انجام شده است، در یکی از این مطالعات به بررسی حذف ژنتیکی قطعه ۳۰ KB از لوکوس

است. DNA اندونوکلاز Cas9 از دو حوزه آنزیمی نوکلئاز، HNH و RuvC برای برش مناطق هدف تشکیل شده است. حوزه HNH نوکلئاز رشته‌های مکمل DNA را می‌شکافد، در حالی که حوزه RuvC نوکلئاز مخالف رشته‌های DNA است. بدین صورت سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas توسط آنزیم‌های نوکلئاز موجود در Cas منجر به برش اختصاصی در جایگاه هدف می‌شود و این ویژگی منجر به استفاده از آن برای طیف وسیعی از اهداف زیست فناوری گردیده است (شکل ۲).



شکل ۲: مکانیسم عمل سیستم ویرایش ژنوم CRISPR-Cas9 (۴۹)

کاربرد CRISPR-Cas در تولید طیور تراخت: سیستم ویرایش

ژنوم CRISPR/Cas9 به طور وسیعی برای تولید پرندگان تراخت کاربرد پیدا کرده‌اند (۱۱، ۵۰، ۵۱). به گونه‌ای که اولین مطالعه در جوجه‌ها در سال ۲۰۱۵ منتشر شد و شامل الکتروپوراسیون جنین مرغ با پلاسمیدهای رمزگذار Cas9 و هدایت RNA در برابر فاکتور رونویسی PAX7 بود. نتایج این مطالعه به وضوح نشان داد که این سیستم به طور موثری قادر به ویرایش ژن در جنین جوجه است (۵۲). سپس دومین مرغ ویرایش ژنوم شده توسط سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 در سال ۲۰۱۶ گزارش شد. در این مطالعه برای کاهش پاسخ ایمنی افراد حساس به پروتئین‌های اووالبومین و اووموکویتید سفیده تخم مرغ به تولید مرغ‌های تراخت حذفی در این دو پروتئین در PGC با سیستم CRISPR/Cas9 پرداختند. سپس PGCs دارای جهش در ژن OVO جنین گیرنده پیوند داده شد و منجر به تولید خروس‌های تراخت شد که در نهایت در تلاقی با مرغ وحشی، نسل اول هتروزیگوت و نسل دوم هموزیگوت تولید گردید و نشان داد که سیستم CRISPR/Cas9 یک روش ساده و موثر برای ژن تارگتینگ در جوجه محسوب می‌شود (۱۱). هم‌چنین تولید اینترفرون انسانی بتا (*hIFN-b*) توسط HDR با واسطه CRISPR/Cas9 در جایگاه اووالبومین موفقیت‌آمیز بود و منجر به تولید مرغ‌ها تولیدکننده مقادیر بالای *hIFN-b* در سفیده تخم مرغ (۱/۸۶-۴/۴۲ میلی گرم در میلی لیتر) گردید (۵۳). این مطالعه برای اولین بار موفقیت هدف‌گیری ژن با واسطه HDR در PGCs مرغ با استفاده از CRISPR/Cas9 را نشان داد. انتقال کاست‌های ژنی برون‌زا

مکانیسم عمل سیستم CRISPR-Cas: مکانیسم عملکردی

سیستم CRISPR-Cas در سه مرحله سازگاری (Adaptation)، بیان (Expression) و تداخل (Interference) انجام می‌شود. در مرحله سازگاری درج جداکننده جدید در لوکوس CRISPR اتفاق می‌افتد و سپس مرحله تکامل یک‌پیش‌نیاز برای مرحله بیان و تداخل است که موجب حافظه ژنتیکی و به‌خاطر سپردن اسیدنوکلئیک تهاجمی و خارجی برای خنثی کردن آن می‌باشد. در واقع این مکانیسم قدرتمند CRISPR به سه گروه I، II و III تقسیم‌بندی می‌شود که مکانیسم عملکردی آن‌ها به شرح زیر است (۴۳، ۴۴، ۴۵). در مرحله اول که تزریق فاژ نامیده می‌شود، بعد از ورود عناصر ژنتیکی خارجی (باکتریوفاژها یا پلاسمیدها)، به سلول، آنزیم‌های ویژه مرتبط CRISPR به نام Cas (CRISPR-associated protein) منجر به جداسازی توالی‌های spacer از توالی‌های protospacer می‌شوند و سپس به لوکوس‌های کریسپر موجود در ژنوم پروکاریوت‌ها متصل می‌شوند. در مرحله دوم برای شناسایی دقیق سیستم CRISPR، این spacerها بین تکرارهای مستقیم تقسیم می‌شوند. در نهایت در مرحله سوم که مرحله بیوژنز و پردازش CrRNA است، برای هر نوع سیستم CRISPR منحصر به فرد است. بدین گونه که در سیستم CRISPR نوع I و III، ریبونوکلازهای مرتبط با CRISPR منجر به شکستن رونوشت pre-CrRNA می‌شوند که آزادی چندین CrRNAs کوچک را در پی دارد. سپس CrRNAهای بالغ، برای تشخیص و تخریب توالی هدف به درون افکتورهای کمپلکس‌های پروتئینی فراخوانده می‌شوند که برای تسهیل شناسایی توالی هدف از چند پروتئین مداخله‌گر تنظیم‌کننده استفاده می‌کنند. در CRISPR نوع I، کمپلکس Cascade با یک مولکول CrRNA فراخوانده می‌شود که یک مجموعه نظارتی منحصر به فردی است که DNA هدف را شناسایی می‌کند. بدین گونه که نوکلئاز Cas3، لوپ R Cascade را به کار گرفته و به آن متصل می‌شود و واسطه تخریب توالی هدف می‌شود. اما در سیستم CRISPR نوع III، CRISPR به کمپلکس‌های Csm و Cmr متصل و منجر به شکست سوبستراهای DNA و RNA به ترتیب می‌شود (۴۶). از سوی دیگر سیستم CRISPR نوع II به‌طور آزمایشی در سال ۲۰۰۸ تأیید شد (۴۷، ۴۸) و بیش‌ترین مطالعه را دارد. این سیستم CRISPR II فقط از پروتئین Cas9 استفاده می‌کند که به پردازش CRRNA کمک می‌کند و به DNA هدف متصل و آن را برش می‌دهد (۴۲). منابع CRISPR شامل ژن CRISPR RNA فعال شده با ترانس (tracrRNA)، پروتئین Cas9، اسپیسر و توالی‌های CRISPR تکرار شده است. در این مکانیسم منحصر به فرد، tracrRNA به CRRNA هیبرید تشکیل می‌دهند که حاوی عنصر موتیف مجاور (20 nt) نوکلئوتید (nt) و توالی مکمل tracrRNA است. آن‌ها راهنمای ویژه RNA دوگانه را تشکیل می‌دهند که هدایت‌کننده Cas9 را برای شناسایی و قطع توالی هدف DNA

انبوهی از جمعیت منجر به بهبود و یا ایجاد صفات جدیدی در دام و دیگر موجودات گردد و سطح بالایی از پروتئین‌های نوترکیب و محصولات غذایی مورد نیاز جهان را با استفاده از بخش حیوانات تراریخت و دیگر موجودات تراریخت تولید کرد.

منابع

1. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J. and Marshall, V.S. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391): 1145-1147.
2. Meir, Y.J. and Wu, S.C., 2011. Transposon-based vector systems for gene therapy clinical trials: challenges and considerations. *Chang Gung Med J*. 34(6): 565-579.
3. Nassiry, M.R., Ghovvati, S., Mohammadabadi, M.R., Arianezhad, H. and Doosti, M., 2010. The generating methods of transgenic chickens and its potential application in biotechnology. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 2(2): 122-124. (In Persian)
4. Essletzbichler, P., Konopka, T., Santoro, F., Chen, D., Gapp, B.V., Kralovics, R., Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M. and Burckstummer, T., 2014. Megabase scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. 24: 2059-2065.
5. Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S. and Zhang, Y. 2013. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*. 155: 479-480.
6. Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R. and Komatsu, H., 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of virology*. 79(17): 10864-10874.
7. Lillico, S., Sherman, A., McGrew, M., Robertson, C., Smith, J. and Haslam, C., 2007. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(6): 1771-1776.
8. Zhu, L., Van de Lavoie, M.C., Albanese, J., Beenhouwer, D.O., Cardarelli, P.M. and Cuisson, S., 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature biotechnology*. 23(9): 1159-1169.
9. Harvey, A.J., Speksnijder, G., Baugh, L.R., Morris, J.A. and Ivarie, R., 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature biotechnology*. 20(4): 396-399.
10. Rapp, J.C., Harvey, A.J., Speksnijder, G.L., Hu, W. and Ivarie, R., 2003. Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic research*. 12(5): 569-575.
11. Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H. and Tagami, T., 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep*. 6: 23980.
12. Barrangou, R., 2015. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*. 32: 36-41.

توسط HDR با موفقیت در سیستم مرغ با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 بررسی شد، به گونه‌ای که یک سایت *loxP* در منطقه متغیر (منطقه V) از زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین (*IgH*) انتقال داده شد و منجر به تولید جوجه ویرایش شده گردید (۵۴). علاوه بر این، معرفی یک جهش نقطه‌ای با حذف اسید آمینه تریپتوفان ۳۸ (*W38*) در ژن *chNHE1* مرغ به طور موفقیت آمیزی توسط HDR حاصل شد (۵۴). اشکال HDR فرکانس پایین تری نسبت به NHEJ دارد و نیازمند داشتن بازوهای همسانی طولانی در ناقل دهنده است (۵۵). از این رو، حذف ژن با واسطه NHEJ، بسیار مؤثرتر از HDR عمل می‌کند و از ساختارهای ساده و کتور دهنده در ارگانیسم‌های مختلف استفاده می‌شود (۵۶، ۵۷). اولین مورد ویرایش ژنومی با واسطه NHEJ در جوجه، در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. در این مطالعه، یک کاست بیانی *GFP* به جایگاه بین زیرخانواده همولوگ *DNAJ*، عضو اول خانواده *DNAJ1* و تنظیم کننده تکثیر DNA و فاکتور اسپلیسوزومی (*SMU1*)، در کروموزوم Z هدف قرار گرفت و در نتیجه جوجه‌های بیان کننده *GFP* به عنوان یک مدل جنسی پرندگان تولید شد (۵۸). پس از آن، حذف ژن میوستانین (*MSTN*) و *G0/G1 switch gene 2 (G0S2)* در مرغ با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 با موفقیت انجام شد (۵۹، ۶۰). هم چنین ویرایش ژنوم پرندگان به واسطه CRISPR/Cas9 از سلول‌های اسپرم مرغ منجر به بازده هدف گیری ۲۶/۶ درصد و جهش حدود ۳ درصدی به ترتیب در پروتئین‌های *GFP* در ژن‌های *DMRT1* و *double sex* گردید (۶۱). بنابراین استفاده از وکتور اختصاصی جوجه با تکنولوژی CRISPR/Cas9 که حاوی پروموتورهای اختصاصی پرندگان برای بیان gRNA و پروتئین Cas9 هستند، منجر به بهبود اصلاح نژادی در گونه‌های مختلف پرندگان می‌شود (۶۲). به گونه‌ای که پیشرفت‌های اخیر سبب تولید جوجه‌های تراریخت به منظور مطالعه رشد آن‌ها، مقاومت در برابر بیماری‌ها و غیره شده است و هم چنین سیستم ویرایش ژنوم به عنوان ابزاری ارزشمند برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی تنظیم کننده تکوین در جوجه‌ها به عنوان مدل در مطالعات زیست‌شناسی محسوب می‌شود. تکنولوژی‌هایی که به صورت هدفمند مناطقی از ژنوم را ویرایش می‌کنند، نقش مهمی در پیشرفت ژنتیکی و کاهش هزینه‌های مورد نیاز در مقایسه با روش‌های قدیمی ایفا می‌کند و هم چنین با کاهش فاصله نسل منجر به بهبود صفات اقتصادی می‌شوند و بهترین ترکیب آلل‌ها را بسته به شرایط پرورش در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. به گونه‌ای که با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انتظار می‌رود که در آینده‌ای نه چندان دور استراتژی انتقال ژن به طور کامل منجر به تولید تخم پرندگانی که تولید کننده پروتئین‌های دارویی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها هستند، شود. از سوی دیگر در کنار این برنامه‌ها، ویرایش هدفمند ژن‌های اقتصادی در سطح

29. Kawakami, K., Shima, A. and Kawakami, N., 2000. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 11403-11408. 10.1073/pnas.97.21.11403.
30. Urasaki, A., Morvan, G. and Kawakami, K., 2006. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal *cis*-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*. 174: 639-649.
31. Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K. and Takahashi, Y., 2007. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol*. 305: 616-624. 10.1016/j.ydbio.2007.01.043.
32. Tanabe, K., Takahashi, Y., Sato, Y., Kawakami, K., Takeichi, M. and Nakagawa, S., 2006. Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. *Development*. 133: 4085-4096. 10.1242/dev.02566.
33. Mozdziak, P.E. and Petite, J.N., 2004. Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev Dyn*. 229: 414-421. 10.1002/dvdy.10461.
34. Gogarten, J.P., 2006. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC evolutionary biology*. 6: 83-94.
35. Kim, G.D., Lee, J.H., Song, S., Kim, S.W., Han, J.S., Shin, S.P., Park, B.C. and Park, T.S., 2020. Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. *FASEB J*. 34: 5688-5696.
36. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U., 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326(5959): 1509-1512.
37. Bosselman, R.A., Hsu, R.Y., Boggs, T., Hu, S., Bruszewski, J. and Ou, S., 1989. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*. 243(4890): 533-535.
38. Park, T.S., Park, J., Lee, J.H., Park, J.W. and Park, B.C., 2019. Disruption of G0/G1 switch gene 2 (G0S2) reduced abdominal fat deposition, altered fatty acid composition in chicken. *FASEB J*. 33: 1188-1198.
39. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816-821.
40. Redman, M., King, A., Watson, C. and King, D., 2016. What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood*. 4 and Practice Edition. 101(4): 213-215.
41. Jansen, R., Embden, J.D., Gastra, W. and Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 43(6): 1565-1575.
42. Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J. and Koonin, E.V., 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 9: 467-477.
43. Jiang, F. and Doudna, J.A., 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 46: 505-529.
13. Barrangou, R. and Marraffini, L.A., 2014. CRISPR/Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*. 54(2): 234-244.
14. Cong, L., Ran, F.A. and Cox, D., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339: 819-823.
15. Love, J., Gribbin, C., Mather, C. and Sang, H., 1994. Transgenic birds by DNA microinjection. *Nature Biotechnology*. 12(1): 60-63.
16. Sherman, A., Dawson, A., Mather, C., Gilhooley, H., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D. and Sang, H., 1998. Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol*. 16: 1050-1053. 10.1038/3497
17. Perry, M.A., 1988. Complete culture system for the chick embryo. *Nature*. 331(6151): 70-72.
18. Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K. and Kagami, H., 2010. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biology of reproduction*. 83(1): 130-137.
19. Maeda, T., Yamakawa, Y., Masuda, K. and Terada, T., 1997. Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs. *British Poultry Science*. 38: 241-242.
20. Mozdziak, P., Borwornpinyo, S., McCoy, D. and Petite, J., 2003. Development of transgenic chickens expressing bacterial β -galactosidase. *Developmental Dynamics*. 226(3): 439-445.
21. Park, T.S., Kang, K.S. and Han, J.Y., 2013. Current genomic editing approaches in avian transgenesis. *General and comparative endocrinology*. 190: 144-148.
22. Van de Lavoie, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L.T., Gessaro, T.M. and Swanberg, S.E., 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*. 441: 766-769.
23. Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, H.M. and McGrew, M.J., 2012. Efficient genetic modification and germline transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: E1466-E1472.
24. Park, T.S. and Han, J.Y., 2012. PiggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(24): 9337-9341.
25. Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K. and Yasuda, K., 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by micro electroporation. *Dev Growth Differ*.
26. Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y. and Hori, H., 1996. Transposable element in fish. *Nature*. 383: 30-10.1038/383030a0.
27. Kawakami, K., Koga, A., Hori, H. and Shima, A., 1998. Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*. 225: 17-22. 10.1016/S0378-1119(98)00537-X.
28. Kawakami, K. and Shima, A., 1999. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*. 240: 239-244. 10.1016/S0378-1119(99)00444-8.

58. Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(3): 1156-1160.
59. Park, Y.H., Chungu, K., Lee, S.B., Woo, S.J., Cho, H.Y., Lee, H.J., Rengaraj, D., Lee, J.H., Song, C.S. and Lim, J.M., 2020. Host-specific Restriction of Avian Influenza Virus Caused by Differential Dynamics of ANP32 Family. *J. Infect. Dis*. 221: 71-80.
60. Cooper, C. A., Challagulla, A., Jenkins, K.A., Wise, T.G., O'Neil, T.E., Morris, K.R., Tizard, M.L. and Doran, T.J., 2017. Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Res*. 26: 331-347.
61. Park, T.S., Lee, H.G., Moon, J.K., Lee, H.J., Yoon, J.W., Yun, B.N., Kang, S.C., Kim, J., Kim, H., Han, J.Y. and Han, B.K., 2015. Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *FASEB J*. 29(6): 2386-2396.
44. Wiedenheft, B., Lander, G.C., Zhou, K., Jore, M.M., Brouns, S.J.J., van der Oost, J., Doudna, J.A. and Nogales, E., 2011. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*. 477: 486-489.
45. Wright, A.V., Nunez, J.K. and Doudna, J.A., 2016. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*. 164: 29-44.
46. Patrick, D., Hsu, E., Lander, S. and Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Patrick*. *Cell*. 157(6): 1262-1278.
47. Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V. and van der Oost, J., 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 321(5891): 960-964.
48. Cribbs Adam, P., Sumeth, M.W. and Perera, S., 2017. Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 90: 625-634.
49. Zhang, X.H., Tee, L.Y., Wang, X.G., Huang, Q.S. and Yang, S.H., 2015. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther- Nucl Acids*. 4: e264.
50. Zuo, Q., Wang, Y., Cheng, S., Lian, C., Tang, B., Wang, F., Lu, Z., Ji, Y., Zhao, R., Zhang, W., Jin, K., Song, J., Zhang, Y. and Li, B., 2016. Site-directed genome knockout in chicken cell line and embryos can use CRISPR/Cas gene editing technology. *G3 (Bethesda)*. 6(6): 1787-1792.
51. Véron, N., Qu, Z., Kipen, P.A., Hirst, C.E. and Marcelle, C., 2015. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol*. 407(1): 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.08.007>
52. Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K.H., Yi, H., Collarini, E.J., Izquierdo, S., van de Lavoie, M.C. and Leighton, P.A., 2016. Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. *PLoS ONE*. 11: e0154303.
53. Koslova, A., Trefil, P., Mucksova, J., Reinisova, M., Plachy, J., Kalina, J., Kucerovala, D., Geryk, J., Krchlikova, V. and Lejkova, B., 2020. Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 117: 2108-2112.
54. Rong, Z., Zhu, S., Xu, Y. and Fu, X., 2014. Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein Cell*. 5: 258-260.
55. Auer, T.O., Duroure, K., De Cian, A., Concordet, J.P. and Del Bene, F., 2014. Highly efficient CRISPR/Cas 9-mediated knock-in in zebrafish by homology independent DNA repair. *Genome Res*. 24: 142-153.
56. Lackner, D.H., Carre, A., Guzzardo, P.M., Banning, C., Mangena, R., Henley, T., Oberndorfer, S., Gapp, B.V., Nijman, S.M.B. and Brummelkamp, T.R., 2015. A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nat. Commun*. 6: 10237.
57. Lee, H.J., Park, K.J., Lee, K.Y., Yao, Y., Nair, V. and Han, J.Y., 2019. Sequential disruption of ALV host receptor genes reveals no sharing of receptors between ALV subgroups A, B, and J. *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 10: 23.