مجله
تحقیقات دام و طیور
جلد۲- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۲- ص ص۸۱-۸۵

تاریخچه مقاله:
دریافت:۹۲/۰۳/۱۸
پذیرش: ۹۳/۰۵/۱۱

مقاله کوتاه علمی

بررسی جهش در اینترون یک ژن میوستاتین گوسفند لری با استفاده ازروش PCR-SSCP

فریبا سپهوند[۱*]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، جمال فیاضی[۳] و مجید خالداری[۴]

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، استاد و دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۴- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی جهش در اینترون یک ژن میوستاتین در ۱۱۰ رأس گوسفند نژاد لری انجام شد. قطعه ۴۱۴ جفت‌بازی از اینترون یک ژن میوستاتین به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- چندشکلی ساختار تک‌رشته‌ای (PCR-SSCP) تکثیر و ارزیابی شد. برای جایگاه مذکور ۵ الگوی SSCP (ژنوتیپ) و ۵ آلل مشاهده شد. فراوانی آلل‌های A، D، C، E و F به ترتیب برابر ۰/۶۹، ۰/۱۹، ۰/۰۷، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AD، AC، AE و AF نیز به ترتیب برابر ۰/۳۸، ۰/۳۶، ۰/۱۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ بود. مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۱ برآورد گردید. آزمون مربع کای نشان داد که جمعیت مذکور برای این جایگاه در تعادل هاردی و اینبرگ نیست ($P<0/05$).

کلمات کلیدی: ژن میوستاتین، PCR-SSCP، گوسفند لری، چندشکلی

نگارنده پاسخگو: فریبا سپهوند. آدرس: خوزستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، گروه علوم دامی
پست الکترونیک: sepahvand2012@yahoo.com

مقدمه

در حال حاضر هدف از پرورش گوسفند در ایران تولید گوشت می‌باشد، لذا افزایش تولید در این بخش نیازمند اقداماتی نظیر اصلاح نژاد و همچنین راهکارهای کوتاه مدت نظیر بهبود شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای می‌باشد (خالداری، ۱۳۹۰). ژن میوستاتین[1](GDF8) در ناحیه سانترومری کروموزوم شماره دو قرار دارد، دارای سه اگزون، دو اینترون و ۳۷۶ آمینواسید می‌باشد که به‌عنوان یک واسطه بیان ژن در کنترل شکل فیبری ماهیچه نقش داشته و در صورتی که در آن جهشی رخ ندهد با جلوگیری از تکثیر میوبلاست‌ها، رشد عضلانی را متوقف می‌کند (فرهادیان و همکاران، ۲۰۱۱). امروزه با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای DNA امکان شناسایی ساختار اصلی سیستم‌های ژنی و تنوع موجود در جوامع، برای نواحی ویژه‌ای از سطح ژنوم و انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی فراهم گردیده است، بنابراین با استفاده از اطلاعات حاصل از تعیین ژنوتیپ نشانگرها، می‌توان ژنوتیپ یک حیوان را قبل از این که به مرحله بروز برسد، تعیین نمود (هدریک، ۱۹۹۹)، که از دیدگاه اصلاح نژاد اطلاع از ژنوتیپ حیوانات و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها برای برنامه‌ریزی طرح‌های اصلاح‌نژادی و همچنین حفظ ذخایر ژنتیکی لازم و ضروری است. در این زمینه روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از گزینه‌ها می‌باشند (دانشیار، ۱۳۸۲). ناحیه تنظیمی در پروموتور ژن میوستاتین حاوی چندین جایگاه اتصالی و پاسخی برای آندروژن‌ها و گلوکوکورتیکوئیدهاست، به‌طوری‌که بیان ژن میوستاتین در پاسخ به تزریق و افزایش تستوسترون سرمی کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد حذف میوستاتین از آتروفی عضلانی موش‌های تحت درمان با کورتیزول جلوگیری می‌کند، بنابراین می‌توان استنباط نمود که تستوسترون و کورتیزول به ترتیب از طریق کاهش و افزایش بیان میوستاتین رشد عضله اسکلتی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (قراخانلو و همکاران، ۱۳۸۷). ژن میوستاتین پس از سنتز در عضله اسکلتی به گردش خون ترشح می‌شود و در سطح سلول عضلانی از طریق اتصال به گیرنده سرین/ ترئونین کینازی اکتیوین به افزایش بیان P_{21} (مهارکننده سایکلین‌های چرخه سلولی)، کاهش فاکتورهای تنظیمی میوژنیک و در نهایت کاهش تکثیر و تمایز سلول‌های اقماری در میوفیبرهای بالغ می‌انجامد (کامبادور و همکاران، ۱۹۹۷). نتایج نشان می‌دهد که نه جهش در ناحیه کد کننده ژن میوستاتین منجر به تغییرات غیر مشابهی می‌شود که سه تا از آن‌ها منجر به جهش‌های بی‌معنی می‌شود، دو جهش در اگزون یک و جهش دیگر در اگزون دو می‌باشد شش جهش باقی‌مانده در اگزون دو و سه قرار دارد که منجر به کدهای پایان زودرس می‌شود، که این جهش‌ها مسئول فنوتیپ ماهیچه مضاعف است (هیک‌فورد و همکاران، ۲۰۰۹). در طی فعالیت‌های شدید گاوهای با ماهیچه مضاعف نسبت به گاوهای عادی زودتر خسته می‌شوند که مربوط به اسیدوز متابولیکی است و علت آن کاهش جریان خون است که منجر به کاهش انتقال اکسیژن از یک طرف و کاهش فعالیت متابولیسم هوازی در گاوهای با ماهیچه مضاعف نسبت به بقیه می‌شود. توده بزرگ عضلانی در گاوهای با ماهیچه مضاعف منجر به تولید حرارت بیشتر در طی استرس‌های گرمایی می‌شود، که توانایی کمتری برای انتشار حرارت دارند هرچند باید این نکته را متذکر شد که فنوتیپ ماهیچه مضاعف نه تنها به‌وسیله نژاد بلکه توسط تغذیه و جنس نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (جرارد و همکاران، ۱۹۹۱). ارتباط پلی‌مورفیسم ژن میوستاتین با صفات رشد در گوسفند نژاد بلوچی با روش PCR-SSCP، سه الگوی P_1 ، P_2 و P_3 برای اینترون یک ژن میوستاتین را نشان داد که ژنوتیپ الگوی P_1 دارای وزن بدن سنگین‌تر و ارزش اصلاحی بیشتر برای صفت وزن از شیرگیری بود، لذا اینترون یک ژن میوستاتین می‌تواند به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای اصلاح نژاد در گوسفند بلوچی استفاده شود. سایر صفات تحت تأثیر این ژنوتیپ قرار نگرفتند (انصاری و همکاران، ۲۰۰۱). جایگزینی اثرات چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ژن میوستاتین بر روی رشد لاشه و کیفیت گوشت گاو در استرالیا و نیوزلند که با جایگزینی نوکلئوتید سیتوزین به آدنین در اگزون یک صورت گرفت باعث تبدیل اسیدآمینه لوسین به فنیل‌آلانین شد (اسماعیلی‌زاده و همکاران، ۲۰۰۸). با تکثیر قطعه ۴۱۴ جفت‌بازی اینترون یک ژن میوستاتین در گوسفندان رامنی نیوزلند پنج الگوی SSCP (ژنوتیپ) و پنج آلل مشاهده شد (هیک فورد و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی جایگاه ژنی g-6723G-A مشتق شده از ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفت وزن لاشه نشان داد که آلل A اثری بر وزن بدن نداشت بلکه با افزایش عضله و کاهش چربی همراه بود (جانسون و همکاران، ۲۰۰۹). با شناسایی چند شکلی تک

1. Growth differentiation factor 8

نوکلئوتیدی[1](SNP) ژن میوستاتین در نژادهای گوسفند شال، زندی و زل در ناحیه ترجمه نشده ′۳(UTR) مشخص شد که کلیه گوسفندان دارای آلل G هستند که در ایجاد عضله مضاعف نقش نداشت (میار و همکاران، ۱۳۹۰). هدف از این تحقیق بررسی تنوع آللی و ژنوتیپی اینترون یک ژن میوستاتین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- چند شکلی ساختار تک رشته‌ای (PCR-SSCP)[2] در گوسفند لری بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از ۱۱۰ رأس گوسفند نژاد لری به‌صورت کاملاً تصادفی نمونه خون از ورید وداج استخراج و به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان منتقل گردید. استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت DIAtom (ساخت شرکت سیناژن) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و شامل ۳ میکرولیتر از DNA ژنومی، کلرید منیزیم ۰/۷۵ میکرولیتر، ۰/۵میکرولیتر از مخلوط dNTP، ۱میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۶/۰۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز در ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer با شرایط دمایی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد۳۰ ثانیه، نهایتاً یک بسط انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌سانتیگراد انجام شد.آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۴۱۴ جفت‌بازی از اینترون‌یک ژن میوستاتین به شرح زیر بود (هیک‌فورد و همکاران، ۲۰۰۹).

F: 5'-GAAACGGTCATTACCATGC-3'

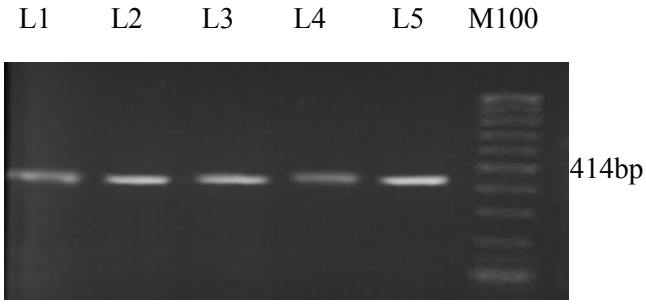
R: 5'-CATATTTCAGGCAACCAAATG-3

به منظور آنالیز چند شکلی ساختار تک رشته‌ای، ۷ میکرولیتر از محلول واسرشت‌سازی، ۳ میکرولیتر محصول PCR و در مجموع ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها در ۹۵ درجه سانتیگراد برای پنج دقیقه واسرشت‌سازی شدند و بر روی یخ سرد شده و تمام حجم حاصل بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد با بافر TBE 1X الکتروفورز شدند. ژل‌ها در ولتاژ ۱۶۰ به مدت ۳-۴/۵ ساعت در سیستم الکتروفورز عمودی (پایا پژوهش VEU-7350) در دمای آزمایشگاه (۱۲-۱۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها از دستگاه خارج و بوسیله نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها به‌وسیله نرم‌افزار GenALEx6.3 انجام شد.

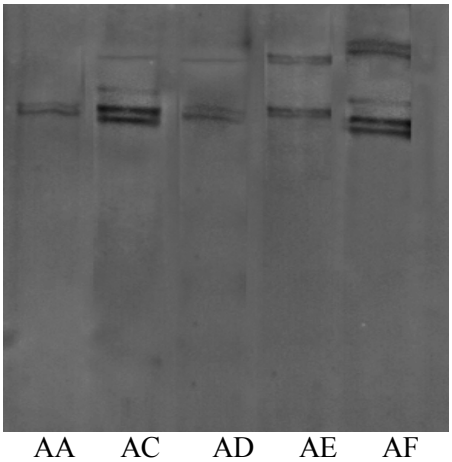
نتایج و بحث

تنوع آللی در ژن میوستاتین با روش PCR-SSCP بررسی شد که در نهایت پنج الگوی SSCP (ژنوتیپ) در گله مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲). فراوانی الگوهای مشاهده شده عبارت بودند از ۰/۳۸، ۰/۳۶، ۰/۱۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ که به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های AA، AD، AC، AE و AF بودند. فراوانی آللی برای آلل‌های A، D، C، E و F به ترتیب برابر ۰/۶۹، ۰/۱۹، ۰/۰۷، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ بود، آلل‌ها و ژنوتیپ‌های به‌دست آمده بر اساس مطالعه (هیک‌فورد و همکاران،۲۰۰۹) مشخص شده‌اند. مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده ژن میوستاتین ۰/۶۱ برآورد شد. تعداد آلل‌های مؤثر ۱/۹۳ و شاخص شانون ۰/۹۵ برآورد گردید. آزمون مربع‌کای نشان داد جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی واینبرگ انحراف دارد (P<۰/۰۵). کلیه DNAهای استخراج شده به صورت تک باند و بدون هر گونه تکثیر غیر اختصاصی بودند (شکل ۱). ژنوتیپ AA بیشترین فراوانی و ژنوتیپ‌های هتروزیگوت AE و AF به ترتیب کمترین میزان فراوانی را در گله نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که چندشکلی ژنتیکی در جایگاه ژنی اینترون یک ژن میوستاتین وجود دارد که با نتایج هیک‌فورد و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت ولی از نظر تعداد آلل با نتایج فرهادیان و همکاران (۲۰۱۱)مغایرت داشت.



شکل۱- محصولات PCR ژن میوستاتین (قطعه ۴۱۴ جفت‌بازی)، بر روی ژل آگارز

1- Single Nucleotide Polymorphism
2- Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism



شکل۲- الگوهای SSCP (ژنوتیپ) مشاهده شده ژن میوستاتین

عدم تعادل هاردی-واینبرگ به این مفهوم است که جمعیت مذکور تحت مدیریت دامدار حداقل دارای مهاجرت یا انتخاب‌های طبیعی یا مصنوعی بوده و یا در شرایط فعلی کلیه ژنوتیپ‌ها شانس زنده‌مانی و تولیدمثل نداشته‌اند. سطح هتروزیگوسیتی یکی از شاخص‌های معرفی میزان تنوع ژنتیکی در یک جمعیت محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در سطح بالایی نشان می‌دهد که نشان دهنده تنوع بالای این ژن در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در اغلب موارد بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار می‌باشد که در غیر این‌صورت علت آن را می‌توان به عواملی مانند وجود آلل‌های نول، آمیزش خویشاوندی و به تبع آن افزایش خلوص ژنتیکی نسبت داد (کشیری و همکاران، ۱۳۹۱). در بررسی چند شکلی ژن میوستاتین و تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت‌بازی در گوسفند سنجابی با روشPCR-RFLP پس از آنالیز بیشترین فراوانی با ۹۷ درصد مربوط به ژنوتیپ mm و آلل m بود (صوفی و همکاران، ۱۳۸۸). در یک تحقیق بررسی اثر آلل A بر روی وزن تولد در آمیخته‌های نژاد لیموزین و جرسی معنی دار نبود که با نتایج این پژوهش در رابطه با وزن تولد مطابقت دارد، نتایج نشان داد که تنوع آللی صورت به صورت ماهیچه مضاعف در فنوتیپ دام نشان داده می‌شود که ناشی از جهش در ژن میوستاتین است (اسماعیلی زاده و همکاران، ۲۰۰۸). فرهادیان و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی با تکثیر قطعه ۴۱۷ جفت‌بازی از اینترون‌یک ژن میوستاتین در گوسفندان ماکویی، چهار الگوی SSCP هتروزیگوت و پنج آلل گزارش کردند که بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل A بود که از نظر تعداد آلل مشاهده شده با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در مطالعات مختلف برای تعیین جهش‌ها در هر ژن از روش‌های متفاوتی از جمله SSCP و تعیین توالی مستقیم استفاده می‌شود، به نحوی که پژوهش‌های زیادی بر روی نواحی اگزون و اینترون ژن میوستاتین انجام شده است. معمولاً حیوانات جهش‌یافته از نظر فنوتیپی با حیوانات عادی تفاوت دارند. به طور کلی insertion (اضافه) و تغییر چارچوب‌های متعاقب آن باعث می‌شوند که رونویسی ژن، برخورد زود یا دیر هنگامی با کدون پایان داشته باشند که منجر به پایان رونویسی و تولید یک پروتئین کوتاه یا بلند می‌شود. تحقیقات انجام شده بر روی ناحیه تنظیمی ژن میوستاتین نشان می‌دهد که هر یک از این جهش‌های تغییر چارچوب و نقطه‌ای باعث تخریب رونویسی و احتمالاً جلوگیری و یا کاهش بیان ژن می‌شود. پروموتور یک بخش حساس است و کوچکترین تغییر در نواحی بخش تنظیمی باعث بر هم زدن کمپلکس رونویسی می‌شود. به‌گونه‌ای که چند شکلی نمونه‌هایی که برای ژن میوستاتین هموزیگوت هستند هیچ تغییری در حجم و توده عضلانی نشان نمی‌دهند (اسکوت و ملدروم، ۲۰۰۱). باید توجه نمود بررسی یک منطقه ژنی به تنهایی نمی‌تواند گواه بر عملکرد مطلوب یا نامطلوب یک صفت در یک نژاد باشد، لذا بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر نیز مورد نیاز است. همچنین نظر به اینکه چندشکلی حاصل در ناحیه غیرکدکننده ژن میوستاتین قرار دارد، نتیجه‌گیری در مورد اینکه چگونه این تنوع ژنتیکی ممکن است روی فعالیت میوستاتین اثر گذارد مشکل است. به عنوان مثال ممکن است این چندشکلی بر ویرایش mRNA مؤثر باشد و یا به عنوان یک مارکر به نواحی کدکننده ای از آن در مکانی دیگر پیوسته باشد که در نهایت بر توالی اسید آمینه آن اثر بگذارد (هانست، ۱۹۹۱).

نتیجه‌گیری کلی

الگوهای SSCP حاصل از اینترون ۱ ژن میوستاتین وجود ۵ آلل و ۵ ژنوتیپ را مشخص نمود که بیشترین فراوانی آللی و ژنوتیپی به‌دست آمده مربوط به A و AA بود. در این جایگاه ژنی چندشکلی مشاهده گردید و آزمون کای مربع انحراف از تعادل هاردی‌واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه را نشان داد. با توجه به موارد گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که ژن میوستاتین دارای تنوع بالایی می‌باشد و این تنوع نشان دهنده اهمیت این ژن به عنوان ژن کاندیدا برای کارهای اصلاح نژادی است.

منابع

خالداری، م.، ۱۳۹۰. اصول پرورش گوسفند و بز. چاپ چهارم، انتشارات جهاد دانشگاهی تهران. ص ۶۰۲.

دانشیار، پ.، ۱۳۸۲. تعیین چند شکلی نشانگرهای ریزماهواره در گوسفند بلوچی ایستگاه عباس‌آباد مشهد. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زابل.

صوفی، ب.، محمدآبادی، م. ر.، شجاعیان، ک.، باقی زاده، ا.، فراستی، س.، عسکری، ن. و دیانی، ا.، ۱۳۸۸. ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از روشPCR-RFLP. مجله پژوهشهای علوم دامی. جلد۱۹، شماره۱.

قراخانلو، ر.، صارمی، ع.، امیدفر، ک.، شرقی، س. و قرائتی، م.ر.، ۱۳۸۷. اثر تمرین مقاومتی بر سطوح سرمی میوستاتتین، تستوسترون و کورتیزول در مردان جوان. فصلنامه المپیک. شماره ۳، صفحات ۴۳-۳۱.

کشیری، ح.، شعبانی، ع. و شعبان‌پور، ب.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه خزر(Rutilus rutillus caspicus) در مناطق قره‌سو و گمیشان به روش میکروساتلایت. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱۴۷-۱۳۹.

میار، ی.، صالحی، ع.ر.، آل یاسین، ا. و رئوف‌زاده، س.، ۱۳۹۰. بررسی چندشکلی ژن میوستاتین در سه نژاد گوسفند ایرانی شال، زل و زندی. مجله تولیدات دامی. شماره ۱، صفحات ۴۰-۳۳.

Ansary, M., Tahmoorespur, M., Nassiry, M. R., Taheri, A. and vafayevaleh, M., 2011. Polymorphism in Intron-1 of myostatin gene and its association with estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep (Ovis aries). Indian Journal of Animal Science. 81(8): 75-00.

Esmailizadeh, A.K., Bottema, C.D.K., Sellick, G.S., Verbyla, A.D., Morris, C. A., Cullen, N.G. and Pitch ford, W.S., 2008. Effects of the myostatin F94L substituation on beef traits. Journal of Animal Science. 86: 1038-1046.

Farhadian, M., Hashemi, A., Mardani, k., Darvish zadeh, R. and Ranjbary, M., 2011. Allelic polymorphism of Makoei sheep myostatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism African Journal of Biotechnology .vol 10(50), pp: 10083-10086 .

Gerard, D.E., Thrasher, K.H., Grant, A., Lemenager, R.P. and Judge, M.D., 1991. Serum-induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscle and normal cattle. Journal of Animal Science. 69:317.

Hanset R J., Owen B., Axford R F E., 1991. Breeding for Disease Resistance in Farm. Journal of Animal Science. P: 225-247.

Hedrik, P.W., 1999. Genetics of population. Second edition. Jones and Bartlett publishers, Sudbury, MA.USA.

Hikford, J.G.H., Forrest, R.H., Zhou, H., Fang, Q., Han, J., Framton, C.m. and Horrell, A.L., 2009. Polymorphism in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zeland Romney sheep. Animal Genetics Immunogenetics, Molecular Genetics. 1365-2052.

Johnson, P.L., Dodds, K.G., Bain, W.E., Greer, G.J., Mclean, N.J., Mclaren, R.J., Galloway, S.M., Van Stijn, T.C. and Mc Ewan, J. C., 2009. Investigations in to the GDF8 g+6723G-A polymorphism in New Zealand Texel sheep. Journal of Animal Science. 87: 1856-1864.

Kambadur, R., Sharman, M., Smith, T.P.L. and Bass, J.J., 1997.Mutation in myostatin (GDF8) in double muscled Belgian Blue and Pidemontese Cattle. Genome Research. 7:910-5.

Scott, R. and Meldrum, C., 2001. Familial adenomatous polyposis more evidence diversity and genetic heterogeneity. Genome Research. 508-514.