ارزیابی چند شکلی ژن آروماتاز در گوسفند زندی با استفاده از روش PCR-RFLP

مریم اشرفی[1]، علیرضا نوشری[1] و مهدی امین افشار[2]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۰۴/۱۵
تاریخ تصویب:۱۳۹۱/۰۶/۲۴

چکیده

ژن Cyp19 که آنزیم P450 سیتوکروم آروماتاز را کد می‌کند با تبدیل آندروژن به استروژن مسئول بیوسنتز استروژن است. این ژن در گوسفند روی باند q24-q31 کروموزوم شماره ۷، قرار دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی چندشکلی ناحیه کد کننده ژن آروماتاز به منظور شناسائی جهش‌های موجود در این ناحیه می‌باشد. برای این منظور از ۹۳ رأس بره زندی نر و ماده در سن شیرگیری نمونه‌های خون تهیه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت (PCR Template purification kit) انجام و نمونه‌های DNA حاصل برای تکثیر قطعه ۱۴۰جفت بازی استفاده شدند. چند شکلی طول قطعات برشی محصولات PCR با افزودن آنزیم برشی BSTMBI به محصول واکنش PCR اجرا گردید. شناسائی ژنوتیپ‌های PCR-RFLP از طریق بارگذاری محصول حاصل از واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد سه ژنوتیپ AB,AA و BB به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۸۶،۰ و ۰/۱۴ در جایگاه مطالعه شده ژن آروماتاز گوسفند زندی قابل شناسائی می‌باشند. فراوانی آللی نیز برای آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۴۳ و۰/۵۷ برآورد گردید. همچنین نتایج نشان داد که تعادل هاردی – واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه در رابطه با این جایگاه برقرار نمی باشد.

کلمات کلیدی: ژن آروماتاز، چند شکلی، گوسفند زندی، PCR-RFLP

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه علوم دامی، کرج، ایران (Ashrafi_m285@yahoo.com)
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم دامی، تهران، ایران

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

مقدمه

آروماتاز[1] یک ترکیب پیچیده آنزیمی است که تبدیل استرول به استرادیول را کاتالیز می‌کند. در سلولهای گرانولوزا، آروماتاز برای ایجادفولیکول و در نتیجه کیفیت اووسیت ضروری است (۶). ژن cyp19 که آنزیم P450 را در گوسفند کد می‌کند بر روی کروموزوم ۷، قرار دارد. در موقعیت ۲۴۲ کروموزوم ۷ اگزون۳ ژن cyp19 یک جهش از نوکلئوتید C به T (C242T) صورت می‌گیرد. ژن cyp19 در بافت چربی، مغز، غده آدرنال و استخوان نیز یافت شده است (۲).مطالعات و بررسی‌های انجام گرفته اثر حضور وفراوانی الل‌هایی از چند شکلی ژن آروماتاز Cyp19 را بر روی صفت رشد وتولید مثل وتوانایی مادری نشان داده است (۲). اثر حضور وفراوانی الل‌هایی از چند شکلی C242T در موقعیت ۲۴۲ از ژن آروماتاز Cyp19 در چند نژاد مختلف از گوسفندان برزیلی ژنوتیپ AA مشاهده نشد و فراوانی ژنوتیپ‌های AB,BB به ترتیب ۰/۳۶و۰/۶۴ بود در نهایت لوبو وهمکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند که حیوانات با ژنوتیپ AB بهترین ارزش نژادی را دارند (۲). رابطه چند شکلی ژن آروماتاز Cyp19 درتعدادی از گاوهای سیاه وسفید جرسی مشخص نمود که فراوانی ژنوتیپ وآلل‌های بدست آمده برای این گاوها شامل AA=۰/۰۸۹۸۵، AB=۰/۰۹۷۷، BB=۰/۰۰۳۸، Cyp19(A)=۰/۹۴۷۴، Cyp19(B)=۰/۰۵۲۶ بود و نتایج بدست آمده نشان داد که هیچ گونه ارتباطی بین چند شکلی ژن آروماتاز و صفت تولید شیر وجود ندارد (۳).با بررسی آلل‌هایی از ژن Cyp19 در گاوهای هلشتاین فریزن لهستانی چند شکلی مشاهده شد در نمونه‌های مورد نظر هر سه نوع ژنوتیپ Cyp19 , AA وAB, BB مشاهده شدند (۸). رابطه چند شکلی ژن آروماتاز Cyp19 روی باروری در گوساله ماده بوفالو مشخص نمود که اگرسطح آروماتاز در تخمدان پایین باشد سطح ۱۷-بتا استرادیول وLH[2] نیز پایین خواهد آمد و در نتیجه فولیکول ممکن است آشکار نشود وحیوان علائم فحلی را نشان نخواهد داد(۷). گاو وگوسفند پروموتورهای مختلفی را برای بیان وهدایت سیتوکروم P450 آروماتاز که ژن Cyp19 را در طول آبستنی کد می‌کنند به کار می‌برند به ترتیب مشخص شد بین گاو وگوسفند پروموتورهای بیان ژن آروماتاز در جفت،(P 1.1) و(P 1.5) است. در گوسفند ژن Cyp19 تحت کنترل چهار پروموتور مختلف است (p1.1،p1.4،p1.5 وp2) که در اندام‌های خاصی فعالیت دارند. جفت، محل اصلی بروز سیتوکروم P450 آروماتاز است که در گوسفند بروز ژن Cyp19 در جفت تحت کنترل پروموتور P1.5 است جفت نقش مهمی را در نیمه دوم آبستنی بازی می‌کند و منبع اصلی از استروژن است (۹). نژاد زندی یکی از بهترین گوسفندان پوستی ایران محسوب می‌شود،اما بدلیل افزایش تقاضا برای گوشت وعدم توجیه اقتصادی تولید پوست،امروزه از این نژاد برای تولید گوشت استفاده می‌شود چرا که از این لحاظ نیز در حد متوسطی قرار دارد. این در حالی است که تا کنون برنامه‌های اصلاحی مدونی برای بهبود عملکرد وبازده اقتصادی در گوسفند زندی اجرا نگردیده یا اهداف مورد نظر حاصل نگردیده است. هدف از انجام تحقیق حاضر شناسایی ژنوتیپ‌های ژن آروماتاز و فراوانی آلل‌های

1- Aromatase

2 -Luteinizing Hormone

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

آن برای اولین بار در ایران و در گوسفند نژاد زندی به کمک روش PCR[1]-RFLP[2] و تعیین میزان چند شکلی در جمعیت گوسفندان زندی بوده است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این طرح،از ۹۳ رأس گوسفند زندی در دامداری‌های قم به طور تصادفی خون گیری به عمل آمد. خون گیری از طریق ورید وداج و با استفاده از ونوجکت‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) به میزان ۳ الی ۵ سی سی انجام گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت (PCR Template purification kit) انجام گرفت و جهت تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید. در این تحقیق، تکثیر در اگزون ۳ در کدون ۶۱ کروموزوم شماره ۷ ژن آروماتاز گوسفند به طول ۱۴۰ جفت باز با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی به شرح زیر صورت گرفت:

‘Forward 5’- CCAGCTACTTTCTGGGAATT-3

‘Reverse 5’_ AATAAGGGTTTCCTCTCCACA-3

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (DNA به میزان ۵/۳ میکرولیتر،بافر PCR به میزان ۱۲/۵میکرولیتر، آب دیونیزه به میزان ۶ میکرولیتر،آغازگر رفت وآغازگر برگشت رقیق شده با آب مقطر، هرکدام به میزان ۰/۶ میکرولیتر) و با برنامه حرارتی زیر:

۹۵ درجه سانتیگراد جهت واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۵دقیقه وتعداد۳۲ چرخه به شرح زیر:

واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمرها به مدت ۲۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط آغازگرها به مدت ۲۵ ثانیه ودر دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در خاتمه بسط نهایی به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. صحت قطعه به دست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵% ورنگ آمیزی سایبرگرین به همراه نشانگر وزنی M100 مورد تأیید قرار گرفت. به منظور برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده حاصل از PCR، از آنزیم محدودگر BSTMBI استفاده شد.محصولات هضم شده با آنزیم بر روی ژل آگارز ۳% الکتروفورز گردید و با استفاده از سایبرگرین رنگ آمیزی شد. مطالعه جمعیتی نمونه و آزمون برقراری تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار POP GENE 3.2 انجام یافت.

نتایج

استفاده از کیت (PCR Template purification kit) جهت استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت وکفیت و صرف زمان لازم در استخراج DNA نشان داد. تکثیر قطعه ۱۴۰ جفت بازی از ژن آروماتاز

1- Polymerase Chain Reaction

2- Restricted Fragment Length Polymorphisms

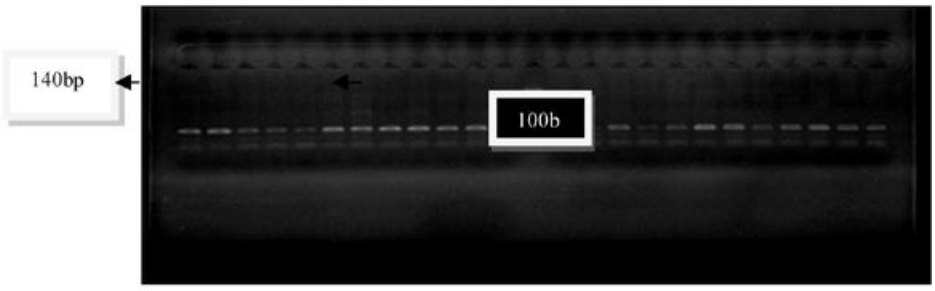
Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت ودر نتیجه استفاده از برنامه حرارتی مناسب آغازگرهای اختصاصی وشرایط خوب آزمایشگاهی که فراهم شد قطعه ۱۴۰جفت بازی بدون قطعات غیر اختصاصی بدست آمد.(شکل ۱) هضم قطعه ۱۴۰ جفت بازی با آنزیم BSTMBI وجود دو نوع ژنوتیپ AB وBB را نشان داد. در صورت وجود جهش در این ناحیه آنزیم BSTMBI منجر به ایجاد برش و ایجاد دو قطعه ۸۲ bp و ۵۸ bp می گردد. در غیر این صورت، یک قطعه ۱۴۰ bp ایجاد می‌گردد که نشان‌دهنده عدم وقوع جهش در قطعه مورد نظر می‌باشد. از این رو ژنوتیپ BB با تولید تنها یک باند به اندازه ۱۴۰ جفت باز و ژنوتیپ AB با تولید سه باند به اندازه‌های۱۴۰, ۸۲ و۵۸ جفت باز قابل شناسائی می‌باشد. در این تحقیق هیچ نمونه‌ای با ژنوتیپ AA مشاهده نشد(شکل ۲). بنابراین ژنوتیپهای AA، AB و BB با فراوانی های۰، ۰/۸۶ و۰/۱۴ در این گله تشخیص داده شدند. فراوانی‌های اللی A و B به ترتیب ۰/۴۳ و۰/۵۷ برآورد گردید. ژنوتیپAB دارای بیشترین فراوانی نسبت به ژنوتیپ BB می‌باشد. و در مجموع تعداد ژنوتیپهای AA، AB و BB به ترتیب برابر ۰، ۸۰ و ۱۳ از نمونه‌ها بوده است. این گله با داشتن فراوانی افراد AB در حدود ۰/۸۶ دارای بیشترین فراوانی هتروزیگوتی میباشد و هموزیگوت‌های BB حدود ۱۴% گله را تشکیل میدهد و افراد با ژنوتیپ AA نیز وجود ندارد. آزمون‌های X2 وG2 نشان دادند که جامعه مورد بررسی در تعادل هاردی واینبرگ قرار نداشت وانحراف معنی داری از این تعادل نشان داد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- تعادل هاردی - واینبرگ وفراوانی ژنوتیپی

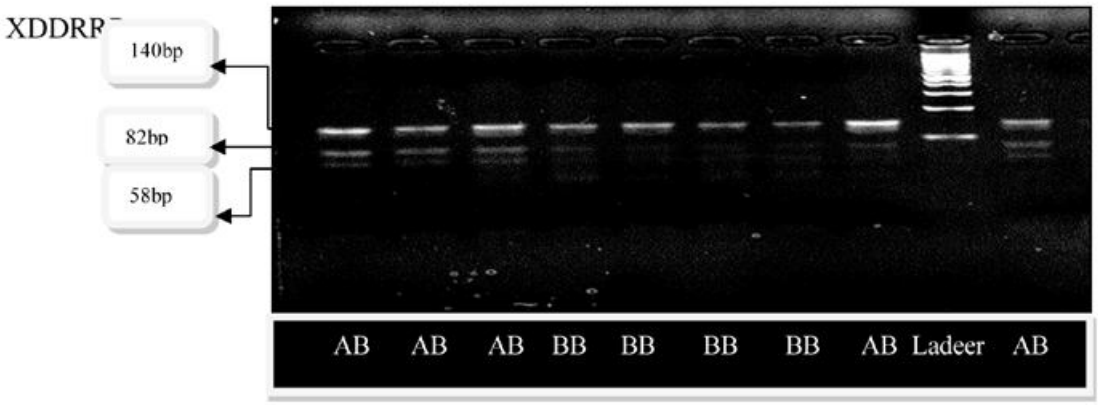
ژنوتیپ	تعداد مشاهده	افراد مورد انتظار	X^2	G^2	فراوانی ژنوتیپی
AA	0	17.08	17.081	0.0001	0
AB	80	45.84	25.460	89.106	0.86
BB	13	30.08	9.699	-21.812	0.14

شکل۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ % درصد



Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

شکل ۲- محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد



بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد جایگاه ژن آروماتاز در نمونه‌های مطالعه شده گوسفند زندی دارای چند شکلی می‌باشد. این امر نشان می‌دهدکه در گوسفند زندی از نظر آلل‌های ژنهای کنترل کننده صفاتی که به تولید و ترشح آروماتاز مربوط است تنوع ژنتیکی وجود دارد. این امر می‌تواند به عنوان ا بزاری در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرد. در صورت وجود ارتباط معنی دار بین چند شکلی‌های شناسائی شده و صفات مهم اقتصادی در این گوسفند، نتایج حاصله می‌تواند در برنامه‌های انتخاب در این گوسفند ارزشمند باشد. درخصوص چند شکلی‌های شناسایی شده در گوسفند زندی می‌توان به ژن میوستاتین، میار وهمکاران (۲۰۱۰) وژن لپتین، برزه کار و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمودکه در هر دو ژن مذکور ارتباط معنی دار بین چند شکلی ژنی با صفات رشد و لاشه در گوسفند زندی وجود نداشت. این گوسفند با توجه به چند شکلی‌های موجود منبع خوبی از تنوع داخل نژادی را فراهم می‌کند و این به دلیل آن است که تا کنون برنامه‌های مدون اصلاح نژادی در این گوسفند انجام نشده است. نتایج حاصله از این تحقیق از نظر چند شکلی ژن آروماتاز با نتایج حاصل از مطالعه لوبو و همکاران (۲۰۰۹)، مگدالنا و همکاران (۲۰۰۶)، وانسلو و همکاران (۲۰۰۴)، کومارو و همکاران (۲۰۰۹)، واسکا و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت. همچنین از نظر جایگاه ژن آروماتاز طبق فراوانی ژنی و ژنوتیپی با نتایج بدست آمده توسط مگدالنا و همکارانش (۲۰۰۶) لوبو و همکارانش (۲۰۰۹) مطابقت **نداشت**. بر اساس نتایج حاصله، جامعه مورد بررسی در تعادل هاردی وینبرگ قرار نداشت وانحراف معنی داری از تعادل هاردی وینبرگ نشان داد. که با نتایج برزه کارو و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص تعادل در جمعیت گوسفند زندی برای ژن لپتین مطابقت نداشت. مهم ترین عامل عدم برقراری تعادل هاردی وینبرگ در جایگاه مورد مطالعه را می‌توان به دلیل وجود عوامل برهم زننده تعادل نظیر انتخاب، مهاجرت، آمیزش‌های غیر تصادفی، جهش و حتی خطای نمونه برداری برشمرد.

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

منابع

1.**Barzehkar R, Salehi A, Mahjoubi F. 2009.** Polymorphisms of the ovine leptin gene and its associationwith growth and carcass traits in three Iranian sheep, Iranian Journal of Biotchnology,7(4):241-246

2.**Bezerra aliveira lobo A. m , noato braga lobo R and rezende paiva S. 2009.** Aromatase gene and its effects on growth,reproductive and maternal ability traits in a multibreed sheep population from Brazil, Genetics and Molecular biology, 32,3: 484-490.

3.**Magdalena J,Iwona S,Slawomir Z,Wilhelm G,Ewa C p and Andrzej D. 2006.** Evaluation of association of the polymorphism in the placenta specific promoter 1.1 of the Cyp19 gene in Black-and-white and Jersey cattle with milk production traits, Arch.Tierz.,Dummerstorf,49.4,311-314.

4.**Miar Y, Salehi A,Aleyasin S, Kolbehdar D and Raoofzadeh S. 2010.** Polymorphisms in Myostatin Gene and its Associationwith Growth and Carcass Traits in Iranian Sheep.of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran; 3Monsanto Company, USA,1(1):33-42

5. **Nikbakht G, Rezaii H, Stear M.J, Talebi M.A, Mahmoudzadeh H. 2010.** Allelic polymorphism in the second exon of Ovar-DRB1 in fat-tailed sheep. Journal of veterinary medicine (SANANDAJ), 4(11):81-87.

6. **Simpson E.R, Mahendroo M.S, Means G.D, Kilgore M.W, Hinshelwood M.M.1994.** Graham-Lorence S, Amarneh B, Yuji I, FisherCR, Michael MD, Aromatase cytochromeP450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.Endocr Rev, 15:342-355.

7. **Suneel kumar O, Sharma D,Singh D and Sharma M.K. 2009.** CYP19 (cytochrome P450 aromatase) gene polymorphism in murrah buffalo heifers of different fertility performance, Rsearch in Veterinary science, 86: 427-437

8.**Szatkowska I,Grzesiak W,Jedrzejczak M, Dybus A,Zaborski Dand Jankowaik D. 2011.** An analysis of Cyp19 and ER genotypes in Polish Holstein-Friesian cows with regard to the selected reproductive traits , Acta Veterinarian Brno, 80:65-71

9.**Vanselow J,Furbass R, Rehbock F, Klautschek G and Schwerin M. 2004.** Cattle and sheep usedifferent promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome p450 encoding gene,cyp19,during pregnancy, Genetic and Molecular Biology, 27,99-11

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (http://www.novapdf.com)

Evaluation of aromatic gene polymorphism in Zandi breed sheep using PCR-RFLP

Ashrafi[1]*.M .,A. Noshary[1] and M.Aminfshar[2]

Received Date: 05/07/2012

Accepted Date:14/09/2012

Abstract

The Cyp19 gene that cods aromatase cytochrome, is responsible for the estrogen biosynthesis by conversion of androgens into estrogen. The gene Cyp19 was located on q24-q31 bands of chromosome7 in sheep. The aim of this study was to evaluate the polymorphism of a coding region of aromatase gene in order to investigate mutations which potentially altering the expression. Blood samples were collected from 93 weaned male and female Zandi lambs. DNA of blood samples was extracted by PCR Tempaet Purification kit and used to amplify a 140-bp fragment of aromatase gene. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR product was performed by adding BSTMBI enzyme to the completed PCR reactions. The PCR-RFLP genotypes identified by loading the digested PCR product on an agar gel. The results showed that three genotypes of AA, AB, BB were detected with a frequency of 0, 0.86 and 0. 14, respectively. Allele frequencies of A and B alleles were 0.43 and 0.57, respectively. Furthermore, the results showed that locus studied was not in Hardy-Weinberg equilibrium.

Keyword: PCR-RFLP- Polymorphism- Aromatase gene- Zandi sheep

1- Department of Animal Science, Karaj Branch, Islamic Azad University,Karaj,Iran

2- Department of Animal Science, science and research Branch, Islamic Azad University,Tehran,Iran

* (Ashrafi_m285@yahoo.com)